Aus der Kinderklinik der Freien Universität Berlin
Kaiserin Auguste Victoria Haus
Direktor: Professor Dr. med. H. Helge

ZUM VERHALTEN VON GESAMTBILIRUBIN UND UNGEBUNDENEM BILIRUBIN NACH APPLIKATION AUSGEWÄHLTER, DAS BILIRUBIN AUS DER ALBUMIN-BINDUNG VERDRÄNGENDER MEDIKAMENTE — EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN AN GUNN-RATTEN UNTER EINSATZ EINES AUTOMATISIERTEN PEROXIDASE-MIKRO-BESTIMMUNGSVERFAHRENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Hermann Ponitz
Homberg/Alsfeld

1985

Aus der Kinderklinik der Freien Universität Berlin
Kaiserin Auguste Victoria Haus
Direktor: Professor Dr. med. H. Helge

ZUM VERHALTEN VON GESAMTBILIRUBIN UND UNGEBUNDENEM BILIRUBIN NACH APPLIKATION AUSGEWÄHLTER, DAS BILIRUBIN AUS DER ALBUMINBINDUNG VERDRÄNGENDER MEDIKAMENTE - EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN AN GUNN-RATTEN UNTER EINSATZ EINES AUTOMATISIERTEN PEROXIDASE-MIKRO-BESTIMMUNGSVERFAHRENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Hermann Ponitz
Homberg/Alsfeld

Referent: Professor Dr. med. L. Ballowitz
Korreferent: Professor Dr. Dr. M. Schöneshöfer

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15.7.1985

Inhaltsübersicht

1. Einleitung S. 5

2. Material und Methode S. 9

3. Ergebnisse S. 17

3.1. In-vitro-Versuche S. 17

3.1.1. Verdünnungsreihen mit einem Bilirubinstandard S. 17
3.1.2. Verdünnungsreihen der Medikamente in Rattenserum S. 26
3.1.3. Verdünnungsreihen der Medikamente in Kinderserum S. 30

3.2. In-vivo-Versuche S. 33

3.2.1. Bilirubin und Alter S. 33
3.2.2. Bilirubin nach Medikamentengabe S. 37

4. Diskussion S. 48

5. Zusammenfassung S. 60

6. Literaturverzeichnis S. 63

Meinen Eltern

1. Einleitung

In Tierversuchen an Gunn-Ratten wies 1959 die Forschungsgruppe um L. Johnson (22) nach, daß nach Injektion von Sulfonamiden die Serum-Bilirubin-Konzentration abfiel. Sie konnten zeigen, daß sich das Gesamt-Bilirubin im Serum im Zeitverlauf umgekehrt zur Sulfonamidkonzentration verhält. Im Gegensatz zu normalen jungen Ratten wies der ikterische Wurf eine hohe Mortalität nach Applikation des Medikaments auf. Die Sektion ergab eine intensive Gelbzeichnung von Depot-Fetten, Bindegeweben und der grauen Substanz des Zentralnervensystems. Ein optisch entsprechendes Phänomen der Basalganglien hat Schmorl 1903 bei verstorbenen Neugeborenen beobachtet und mit dem Terminus 'Kernikterus' belegt.
Bilirubin liegt im Serum in zwei Formen vor, als konjugiertes und als unkonjugiertes, wobei der größere Anteil des letzteren an Serum-Abumin gebunden ist (24). Die Untersuchungen von Johnson u. a. legten den Schluß nahe, daß Sulfonamide Bilirubin aus der Eiweißbindung verdrängen. Das dann freie, ungebundene Bilirubin vermag im Gegensatz zum albumingebundenen Zellmembranen, also auch die Blut-Hirn-Schranke zu permeieren und wirkt zytotoxisch.
Wiewohl Gegenstand zahlreicher Studien ist der Mechanismus der durch Bilirubin verursachten Enzephalopathie nicht in allen Einzelheiten geklärt. Untersuchungen über Interaktionen von Bilirubin mit intrazellulären Elementen liegen vor. Aus der Vielzahl der Befunde seien hier herausgegriffen: Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, Verhinderung der DNA- und Protein-Synthese, kompetitive Hemmung von NAD-abhängigen Enzymen (25), (50).
Wenngleich das Primärschädigungsereignis noch nicht ausgemacht ist, zudem zusätzliche Faktoren wie Azidose, Anstieg freier Fettsäuren, Hunger/Mangelernährung, Hypalbuminämie, Medikamentengabe (9), (33), (50) eintreten müssen, um einen Kernikterus manifest werden zu lassen, kann als erwiesen angesehen werden, daß ungebundenes Bilirubin (UB) als einer

der bedeutsamsten Faktoren für die Entstehung des Kernikterus anzusehen ist.
In den Versuchen von Johnson und Mitarbeitern ist das Verhalten dieses Parameters nach Gabe von Medikamenten, die Bilirubin aus der Albuminbindung verdrängen, nicht bestimmt worden. In der klinischen Praxis beschränkt man sich zur Abschätzung des Risikos eines Kernikterus auf die Bestimmung des Gesamtbilirubins (TB = total bilirubin). Da aber TB nur als ein grober Parameter für diesen Zweck gilt (16)(36), wurden Versuche zur Messung der UB-Fraktion im Plasma unternommen.
Von den verschiedenen entwickelten Nachweisverfahren erwiesen sich die Dialyse (28), die Kalziumcarbonatadsorption (38) ebenso wie Ultrafiltration und Ultrazentrifugierung (7) als insuffizient. Mit der Sephadex-Gel-Filtration (SGF) schien man dann zu Beginn der siebziger Jahre über eine präzisere Methode zu verfügen (6). Das Meßverfahren beruht auf der Eigenschaft des Gels, unter Ausnutzung unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten von freiem und eiweißgebundenen Bilirubin beide Fraktionen voneinander zu trennen. Durch Zusatz von Diazo-Reagens läßt sich UB als blaues Farbband sichtbar machen. Eine quantitative Bestimmung ist möglich nach vollständiger Elution des albumingebundenen Bilirubins durch nachfolgenden Zusatz von Humanalbumin. Unter Einsatz der SGF gelang Semba et. al. (48) in vivo an Gunn-Ratten der Nachweis, daß nach subcutaner Injektion des Medikaments Bucolome^{R} (1-cyclohexyl-5-n-Barbitursäure) das freie Bilirubin im Serum ansteigt.
Mit dem gleichen Bestimmungsverfahren waren von Korn (26) am hiesigen Institut 1976/78 Untersuchungen zum Studium des Einflusses von Sulfonamiden bei jungen und ausgewachsenen Gunn-Ratten durchgeführt worden. Bei den in-vitro-Versuchen wurde die SGF nach Zusatz von ikterischem Serum von Ratten unterschiedlichen Alters in einem hohen Prozentsatz positiv. Ebenfalls positive Resultate ergaben die in-vivo-Versuche bei einigen ausgewachsenen Ratten. Anders bei 5-7 Tage alten Tieren. Hier war die Rate positiver SGF-Teste nach Medika-

mentenapplikation niedriger als in der Kontrollgruppe, deren Heranziehung notwendig war, weil ein Vergleich von SGF vor und nach Sulfonamidgabe am gleichen Tier wegen der benötigten Serummenge nicht möglich war. Dies Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen und steht im Widerspruch zu den Resultaten von Semba.
Zu wiederum abweichenden Ergebnissen waren Oie und Levy 1978 (34) gekommen, die Sprague-Dawley-Ratten, bei denen über eine intravenöse Dauerinfusion von Bilirubin eine künstliche Hyperbilirubinämie erzeugt worden war, das Kurzzeit-Sulfonamid Sulfisoxazol i.v. verabreicht hatten. Bei schneller Applikation des Medikaments war zwar ein Anstieg des UB zu beobachten, der jedoch nur kurz anhielt und schon nach einer halben Stunde auf die Ausgangswerte gesunken war. Bei verzögerter Medikamentenverabreichung mittels einer Dauerinfusion war keinerlei Veränderung der UB-Serum-Konzentration festzustellen. Bei beiden Applikationsformen war TB nach Medikamentengabe abgesunken. Bei der i.v. Injektion erfolgte der Abfall rascher. Als Bestimmungsverfahren bediente man sich des Peroxidase-Verfahrens von Jacobsen und Fedders (21). Dieses fußt auf der von Brodersen und Bartels (12) mitgeteilten Beobachtung, daß freies Bilirubin durch Peroxidase in Gegenwart von Hydrogenperoxid zu einer farblosen Komponente oxidiert wird. Eine Oxidation des albumingebundenen Bilirubins wird durch das Albumin inhibiert. Die initiale Geschwindigkeit der Reaktion ist der Substratmenge proportional (20). Nakamura und Lee (30) modifizierten 1977 diese Methode, indem sie anstelle des Hydrogenperoxids Glucose und Glucoseoxidase einsetzten. Aufbauend auf diesem Prinzip stellten Shimabuku und Nakamura (49) 1982 ein Gerät vor, das eine automatische Bestimmung von TB und - vor allem - UB zuläßt.
Es bot sich deshalb an, zur Überprüfung der sich widersprechenden Untersuchungsergebnisse Studien unter Einsatz des von Nakamura entwickelten Peroxidase-Mikro-Bestimmungsverfahrens durchzuführen.

Das Tiermodell wurde gewählt, weil in-vivo-Versuche bei Neugeborenen wegen der unmittelbaren Gefährdung dieser durch Auslösung eines Kernikterus von vorneherein nicht in Frage kamen.

2. Material und Methode

Die in-vivo-Untersuchungen wurden an zwei Gruppen homozygoter Gunn-Ratten durchgeführt. Das Alter der Tiere betrug in der einen Gruppe 3-12 Tage, in der anderen 1-3 Monate. Gunn-Ratten sind Abkömmlinge der Wistar-Ratte und weisen eine erhöhte Serum-Bilirubin-Konzentration auf. Dies ist zurückzuführen auf einen Mangel an UDP-Glucuronyltransferase. Dieser Enzymdefekt ist rezessiv-autosomal erblich. Homozygote Tiere sind somit unfähig, Bilirubin und Glucuronsäure zu konjugieren, was Voraussetzung für eine Ausscheidung von Bilirubin ist, da nur das Bilirubin-diglucuronid wasserlöslich ist. Folge dieses Enzymdefektes, der beim Menschen dem Crigler-Najjar-Syndrom entspricht, ist ein Rückstau von (indirektem) Bilirubin im Organismus. Bei Überschreiten der Bindungskapazität des Albumins diffundiert der lipophile Gallenfarbstoff in Leber, Basalganglien, Haut und andere Organe. Bei homozygoten Tieren entwickelt sich die Hyperbilirubinämie bald nach der Geburt und erreicht einen Höhepunkt zwischen dem 14. und 16. Tag. Die Hyperbilirubinämie besteht zwar lebenslang, geht aber nach einigen Wochen, vermutlich wegen der Eröffnung alternativer Verstoffwechslungswege (37), auf Werte zwischen 4-8mg/dl zurück (45). Während der ersten Lebenstage sind Gunn-Ratten bis auf den Ikterus unauffällig. Bei den meisten Tieren werden neurologische Ausfälle wie Lethargie, Athetose und verminderte Gewichtszunahme nach ca. vier Wochen manifest.
Im ZNS lassen sich degenerative Vorgänge schon vom dritten Lebenstag an beobachten (45). Die Läsionen sind zuerst in den Purkinje-Zellen nachweisbar und äußern sich im Auftreten von Membran-Körpern und einer Anhäufung glykogenähnlichen Materials in Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum. Um den 14. Lebenstag findet sich eine disseminierte Degeneration von Neuronen. Wegen der Kombination von neurologischen Ausfällen und Zelldegenerationen gilt die Gunn-Ratte als brauchbarstes Tiermodel zum Studium des Kernikterus.

Die Tiere entstammten der Zucht des Kaiserin Auguste Victoria Hauses. Für die Aufnahme in unsere Versuche waren Homozygotie und Alter die ausschlaggebenden Parameter. Eine besondere Haltung wurde nur bei den Tieren praktiziert, die für die Versuche zum Studium des Einflusses unterschiedlicher Ernährungsbedingungen bestimmt worden waren: Zwei Würfe wurden nach der Geburt getrennt. Eine Wurfhälfte (3 bzw. 4 Tiere) verblieb beim Muttertier, die andere wurde zu einem fremden Muttertier mit eigenem Wurf verbracht, so daß die Wurfhälften über unterschiedliche Säugemöglichkeiten verfügten.-

Alle Tiere wurden gezeichnet und von jedem Tier wurden folgende Daten erhoben und protokollmäßig dokumentiert: Homozygotie, Alter/Geburtsdatum, Geschlecht, Gewicht am jeweiligen Versuchstag, Hämatokrit zum Ausschluß einer medikamentenbedingten Hämolyse.

Das Blut wurde bei den Tieren aus dem Schwanz gewonnen. Zu diesem Zweck wurde von der Schwanzspitze ein 1-2 mm großes Stück abgeschnitten. Zur schnelleren Blutgewinnung wurde das Blut vorsichtig aus dem Schwanz herausgestrichen. Das austretende Blut wurde in Kapillarröhrchen (DADE^{R}, Microhematocrit Capilets, Mammonium Heparin 4-6 USP Units, Fa. Division American Hospital Supply Corporation, Miami, Flo) aufgefangen. Anschließend wurde die Schwanzspitze mit einem erhitzten Glasröhrchen zur Vermeidung von Infektionen koaguliert. Die Kapillaren wurden unmittelbar nach Füllung in einem lichtgeschütztem Behältnis aufbewahrt, um einer Veränderung des Bilirubins durch Lichtexposition vorzubeugen. Zentrifugiert wurde zehn Minuten in einer Zentrifuge der Fa. Haereus Christ, 'Microfuge' HC 10, Typ 1680. Zur Gewinnung des Serums wurden die Kapillaren oberhalb der Buffy-Coat-Schicht abgebrochen und das Plasma in Plastikröhrchen ausgeblasen. Aus diesen erfolgte dann die Entnahme für die Bilirubinbestimmungen.

Bei nahezu sämtlichen Versuchen wurde die Gesamt-Bilirubin-Konzentration mit dem Bilirubinometer der American Optical Corporation (dieser Bilirubinwert wird im folgenden mit BA

bezeichnet) bestimmt. Dies Gerät mißt direkt photometrisch gegen einen Glasfilterstandard die Bilirubinkonzentration eines Serums, das in eine zu diesem Gerät zugehörige Küvette gefüllt wird. Nach der Bestimmung wurde das Serum entweder verworfen oder, wenn wenig Serum vorlag, wieder zurückgewonnen.
Anschließend wurden TB und UB in 25µl Serum mit dem UB-analyzer UAF-1 von Arrows & Co.,Osaka, Japan, bestimmt. Der Apparat war geliehen von der deutschen Vertretung von Fujisawa: A. Johnson & Co., Erkrath. Fujisawa Pharmaceutical Co. unterstützte uns durch Überlassung der standardisierten Reagenzien:
- Phosphat-Pufferlösung
- Lyophilisierter Glucoseoxidase/Peroxidase (GOD/POD)
- Lösungsmittel zur Auflösung des Lyophilisats.

Die Bestimmung von TB erfolgt unter Ausnutztung der unterschiedlichen Lichtabsorption von Bilirubin und Hämoglobin. Während Bilirubin ein Absorptionsmaximum bei 460nm hat, liegt dieses für Hämoglobin bei 570nm. Bei beiden Wellenlängen wird photometrisch die Absorption bestimmt und über einen integrierten Computer-Schaltkreis die Absorptionsdifferenz bestimmt, so daß die Serum-Konzentration von Bilirubin unabhängig vom Einfluß einer möglichen Hämolyse ermittelt werden kann. Die Anzeige erfolgt digital. Nach Zugabe von Peroxidase wird UB im Gegensatz zum albumingebundenen Bilirubin oxidiert. Die Geschwindigkeit der Oxidationsreaktion und die Konzentration folgt der folgenden Gleichung:

$$v_o = k \cdot [Bil] \cdot [Pod]$$

dabei sind
[Bil] : Konzentration von UB
[Pod] : Konzentration von Peroxidase
k : Experimentell bestimmte Reaktionskonstante

Da diese Gleichung in der Computer-Einheit des Gerätes gespeichert ist, kann die Abnahme der Bilirubinkonzentration spektrophotometrisch ermittelt und die Konzentration von UB errechnet werden.

Ein eingebauter Inkubator garantiert eine gleichbleibende Bestimmungstemperatur von 30 $\pm$ 0,3C^{O}. Für die Durchmischung der zu bestimmenden Lösung sorgt ein Elektromagnet, der in die Glasröhrchen zugegebene, ferromagnetische Metallteilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit wirbelt.

Die Reihenfolge der Arbeitsschritte zur Bestimmung der Seren war wie folgt:

In die acht zu dem Gerät gehörigen Glasröhrchen wurde jeweils 1 ml Pufferlösung pipettiert, mit einer Pinzette ein Ferro-Metallteilchen zugegeben und drei Minuten inkubiert. Nach Verbringung eines Glasröhrchens in die optische Einheit wurde mit einer Spezialpipette 25µl Serum zugegeben. Der erhaltene TB-Wert wurde gespeichert. Dann wurde 25 µl GOD/POD-Reagenz dazupipettiert. Nach Dokumentation des TB- und UB-Wertes wurde das Glasröhrchen entfernt und zur Säuberung in ein Becken mit aqua dest. gegeben. Damit stand das Gerät für eine neue Bestimmung zur Verfügung.

Bei nahezu sämtlichen Versuchen wurden Doppelbestimmungen der TB- und UB-Werte durchgeführt. Von diesem Prinzip wurde nur dann abgewichen, wenn zu geringe Serummengen zur Verfügung standen. Zur Zubereitung der Reagenzien wurde das lyophilisierte Enzym in 3ml des Lösungsmittels aufgelöst. Die Reagenzlösung wurde an jedem Versuchstag neu zubereitet, da aus Vorversuchen bekannt war, daß längeres Stehen zur Inaktivierung derselben führt (19).

Für die in-vivo Versuche wurden den Tieren drei Medikamente subcutan injiziert:

100 mg/kg KG Sulfadimethoxin, Madribon^{R}.

Sulfadimethoxin (Strukturformel in (17)) ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Sulfonamide, die als "klassische" Stoffe zum Studium des Einflusses von Medikamenten auf die Bilirubin-Albuminbindung angesehen werden können. Diese Wirkung ist häufig untersucht worden, u.a.

von (2), (4), (8), (9), (26), (37), (42), (45), (46), (48). Die Testdosis wurde aus Arbeiten von (2), (4), (26), (42), (45), (46) übernommen.

50 mg/kg KG 1-cyclohexyl-5n-Barbitursäure, Bucolome^{R}.
Bucolome^{R}, ein Barbitursäurederivat, wurde, nachdem Yamamoto und Sakamoto (55) von seinem bilirubinsenkenden Effekt berichtet hatten, zunächst eingesetzt zur Prophylaxe/Behandlung der Neugeborenenhyperbilirubinaemie (Segni (47)). Daß es Bilirubin vom Albumin verdrängt, teilten Yamamoto und Adachi (54) mit. Yamayi et al. (53) konnten zeigen, daß das Medikament in vitro zu einem Anstieg von freiem Bilirubin führt. Semba et al. (48) führten mit Bucolome ^{R} in-vivo-Versuche (an Gunn-Ratten) durch. Bei der Wahl der Dosis hielt ich mich an (48).

100-200 mg/kg KG Coffein-Natrium-Benzoat.
Als Indikation für Coffein-Na-Benzoat werden im Merck-Index (17) "Herzkrankheiten, damit verbundenem Hydrops und Herzschwäche im Verlaufe von Infektionskrankheiten wie Pneumonie" angegeben. Das Medikament enthält im Durchschnitt 47-50% wasserfreies Coffein. Natrium-Benzoat dient als Lösungsvermittler von Coffein in Wasser. Zum gleichen Zweck wurde es in Diazepam injectabile eingesetzt. Die Wirkung von Na-Benzoat auf die Bilirubin-Albuminbindung ist von Nathenson et al. (32), Brodersen (10) und Schweitzer (46) und die von Coffein-Na-Benzoat von Ballowitz und Hanefeld (3) und Schiff et al. (41) untersucht worden. Letztere konnten zeigen, daß Na-Benzoat das wirksame Agens ist und weiterhin, daß das Kombinationspräparat zu einer Verstärkung des Effektes gegenüber Na-Benzoat allein führt. Bei der Wahl der Dosis folgte ich Ballowitz und Hanefeld (3).

Vor der Injektion und (3-5), 15, 30, 60 Minuten und - sofern die Tiere überlebten - 24 Stunden nach Injektion erfolgte die Blutentnahme nach der oben beschriebenen Methode.

Die gleichen Medikamente wurden auch eingesetzt bei den in-vitro Versuchen.
Zum Studium des Einflusses unterschiedlicher Medikamentenkonzentrationen auf TB und UB wurden Verdünnungsreihen der Medikamente angelegt. Dabei wurde angestrebt, die Differenz zwischen vorgelegter Serummenge und Volumen des (verdünnten) Medikaments möglichst groß ausfallen zu lassen, weil dies den in-vivo-Verhältnissen am ehesten entsprechen dürfte. Die Menge des vorgelegten Serums wurde auf allen Verdünnungsstufen konstant gehalten. Weil der Medikamentenwirkstoff (in mg) in unterschiedlicher Konzentration in seiner Lösung vorlag (in ml), mußten den einzelnen Medikamenten unterschiedliche Mengen von H_2O zugesetzt werden, um auf das angestrebte Verdünnungsverhältnis zu kommen. Die Verdünnungsfaktoren zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen betragen bei Madribon^R 4, bei Coffein-Na-Benzoat und Bucolome^R jeweils 2. Eine Vereinheitlichung war nicht möglich, weil bei allen Verdünnungen als Mengen Vielfache von 25 µl gewählt werden mußten, eine Menge, die aus technischen Gründen am exaktesten zu pipettieren war. Das Schema einer Verdünnung folgt den üblichen Regeln zur Herstellung einer Verdünnungsreihe (Wiesmann (52)).
Die einzelnen Konzentrationen wurden dem ikterischen Serum eines Neugeborenen, bei dem eine Austauschtransfusion nötig geworden war, und einem gepoolten Serum ca. 1 Monate alter Ratten zugegeben. Zur künstlichen Steigerung der Bilirubinwerte waren die Tiere 2-3 Tage vorher in verdunkelten Ställen untergebracht.
Desweiteren wurden Verdünnungsreihen von einem Bilirubinstandard angelegt. Der Standard bestand aus kristallinem Bilirubin (Fa. Merck) und 20%igem Humanalbumin (Deutsches Rotes Kreuz, Blutspendedienst Niedersachsen) in einem molaren Verhältnis von etwa 1:1. 100 ml Lösung enthielten 50mg Bilirubin und 28,42 ml Humanalbumin; aufgefüllt wurde mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Verdünnung des Standards erfolgte mit aqua dest., 0,9% NaCl und 5%igem Humanalbumin. Auf den einzelnen Verdünnungsstufen waren Konzentrationen

von 50mg/dl bis herunter auf 5mg/dl Bilirubin vorgelegt. Folgende quantitativen Beziehungen liegen diesen Versuchsreihen zugrunde:

Wenn A=Albumin, B=Bilirubin und AB=Albumin-Bilirubin-Komplex ist, läßt sich nach dem Massenwirkungsgesetz bei Voraussetzung nur einer Bindungsstelle formulieren:

$$A + B \rightleftharpoons AB \text{ und}$$

$$K = \frac{[AB]}{[A]\,[B]}$$

Sei

C_A = eingewogene Albuminmenge,

C_B = eingewogene Bilirubinmenge,

dann gilt

$$C_A = A + AB \Rightarrow A = C_A - AB = C_A - C_B + B$$

$$C_B = B + AB \Rightarrow AB = C_B - B$$

$$K = \frac{C_B - B}{(C_A - C_B + B)\cdot B} \Rightarrow B^2 + B\left(C_A - C_B + \frac{1}{K}\right) - \frac{1}{K} C_B = 0$$

$$\Rightarrow B = \frac{1}{2}\left(C_B - C_A - \frac{1}{K}\right) + \sqrt{\frac{1}{4}\left(C_B - C_A - \frac{1}{K}\right)^2 + \frac{1}{K} C_B}$$

M_{Bili} = 585g $\Rightarrow$ C_B = 50mg% = 0,855mmol/l

M_{Alb} = 65000g $\Rightarrow$ C_A=28,4ml 20% auf 100ml = 5,68g% = 0,8738mmol/l

Bei Verdünnung mit 0,9% NaCL bzw. aqua dest. ergeben sich die folgenden Konzentrationsberechnungen:

C_{Bili} mg%	C_{Bili} mmol/l	C_{Alb} mmol/l	C_{UB} µg/dl
50	0,8550	0,8738	5,64
40	0,6840	0,6990	5,64
30	0,5130	0,5243	5,64
25	0,4275	0,4369	5,64
20	0,3420	0,3495	5,64
15	0,2565	0,2621	5,64
10	0,1710	0,1748	5,62
5	0,0855	0,0874	5,59

und bei Verdünnung mit 5% Albumin

c_{Bili} mg%	c_{Bili} mmol/l	c_{Alb} mmol/l	c_{UB} µg/dl
50	0,8550	0,8738	6,10
40	0,6840	0,8529	2,45
30	0,5130	0,8320	1,23
25	0,4275	0,8215	0,88
20	0,3420	0,8110	0,61
15	0,2565	0,8006	0,41
10	0,1710	0,7901	0,25
5	0,0855	0,7797	0,11

Setzt man die experimentellen Daten aus den Versuchen von Seite 17 bzw. 21 in einem least sqare program in die auf Seite 15 angegebene Formel ein, ergibt sich ein Wert von $K = 5{,}5 \cdot 10^7$ l/mol. Die Bindungskonstante gibt Brodersen (10) mit $K = 7 \cdot 10^7$ l/mol = $7 \cdot 10^4$ l/mmol an. Die Abweichung zum Literaturwert läßt sich durch die differenten Meßtemperaturen ($37^o/20^o$) erklären. Die Übereinstimmung zwischen $5{,}5 \cdot 10^7$ und $7 \cdot 10^7$ ist unter diesen Umständen als recht gut anzusehen.

3. Ergebnisse

3.1. In-vitro-Versuche

3.1.1. Verdünnungsreihen mit einem Bilirubinstandard

- 0,9% NaCl als Verdünnungmittel

Die Ergebnisse der beiden Versuche mit den Verdünnungsreihen des Bilirubinstandards in 0,9% NaCl zeigen Tab./Abb. 1a/1b:

Tab.1a: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard - 0,9% NaCl als Verdünnungsmittel

vorgelegte Bilirubin-konzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	TB/C_{Bili} 1/100 %	UB [µg/dl]
50	>30	39,7	(0,79)	2,66
40	30,6	33,8	0,85	2,56
30	23,6	25,3	0,84	2,39
25	20,4	21,7	0,86	2,71
20	16,3	17,6	0,88	2,52
15	12,8	13,4	0,89	2,50
10	8,5	8,4	0,83	1,60
5	4,1	4,2	0,84	0,92

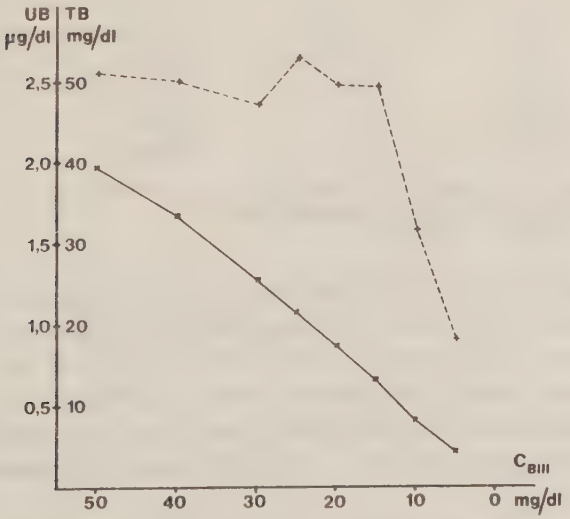

Abb.1a: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard 0,9% NaCl als Verdünnungsmittel, (×———×TB,+- - - -+UB)

Tab.1b: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard - 0,9% NaCl als Verdünnungsmittel

vorgelegte Bilirubin-konzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
50	>30	39,6	2,67
40	30,2	33,6	2,64
30	23,9	25,4	2,56
25	20,3	21,4	2,48
20	16,3	17,3	2,43
15	12,8	13,5	2,40
10	10,1	10,4	1,92
5	3,1	3,6	0,79

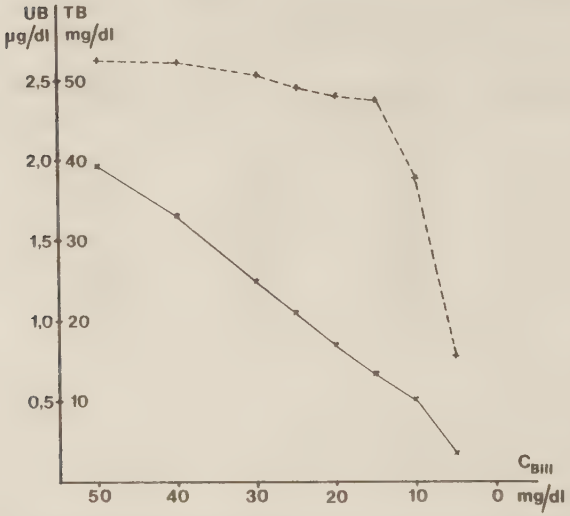

Abb.1b: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard - 0,9% NaCl als Verdünnungsmittel
(*———*TB, +– – –+ UB)

In beiden Reihen sinkt TB von fast identischen Ausgangswerten nahezu linear ab, wobei die beiden Werte bei Verdünnungsstufe 7 (=10 mg Bilirubin) und 8 (=5mg Bilirubin) bei Verdünnungsreihe (VdR) 1 geringfügig höher liegen als bei VdR 2. Die Meßwerte von TB, bestimmt sowohl mit dem analyzer als auch mit dem Gerät der AOC, verlaufen unterhalb 30mg/dl

in beiden Kurven nahezu parallel. Nach Angaben des Herstellers erstreckt sich der Meßbereich des Gerätes der AOC nicht über 30mg/dl. Gegenüber TB ist die Abweichung zur Einwaage bei diesem Gerät größer.
Beim UB ist der Kurvenverlauf anders: Bis zur Verdünnungsstufe 6 (=15mg Bilirubin) ist UB nahezu konstant. Erst auf den beiden letzten Verdünnungsstufen setzt ein Abfall ein: in VdR 1 über 1,62µg/dl auf 0,92µg/dl, in VdR 2 auf 0,79µg/dl.

- aqua dest. als Verdünnungsmittel

Wird als Lösungsmittel für den Bilirubinstandard aqua dest. verwandt, so sind die Ergebnisse nicht grundsätzlich anders als in den beiden vorherigen Versuchen (Vgl. Abb.2).

Tab.2: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard
- aqua dest. als Verdünnungsmittel

vorgelegte Bilirubin-konzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
50	>30	38,8	2,56
40	27,7	29,8	2,57
30	24,0	25,7	2,75
25	20,2	21,6	2,55
20	16,3	17,5	2,39
15	10,9	11,2	1,98
10	8,4	8,7	1,64
5	3,8	4,4	0,88

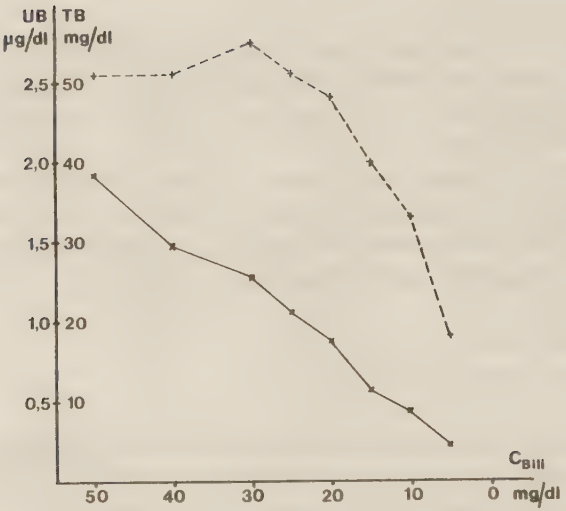

Abb.2: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard - aqua dest. als Verdünnungsmittel (×———× TB, +– – –+ UB)

Bei TB und BA ist eine nahezu lineare Abnahme vom Ausgangswert 38,8mg/dl (TB), bzw. >30mg/dl (BA) auf den Endwert 4,4mg/dl (TB) bzw. 3,8mg/dl (BA) zu beobachten.
UB folgt im wesentlichen den Kurven der Versuche mit Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel. Im Gegensatz zu diesen setzt der Abfall aber schon auf Verdünnungsstufe 5 (=20mg) ein, um sich dann auf den Stufen 7 und 8 den Werten der vorhergehenden Versuche anzugleichen.

- 5% Albumin als Zusatz zum Verdünnungsmittel

Bei Verwendung einer 20% Albuminlösung, die mit 0,9% NaCl auf eine 5%-Lösung herunterverdünnt worden war, ergaben sich die Werte, die in Tab.3 bzw. Abb.3 ausgewiesen sind.

Tab.3: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard
- 5% Albumin als Verdünnungsmittel
(20% Albumin, verdünnt mit 0.9% NaCl)

vorgelegte Bilirubin-konzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	TB/C_{Bili} 1/100 %	UB [µg/dl]
50	>30	39,6	0,79	2,59
40	30,2	33,5	0,84	1,82
30	23,6	25,6	0,85	1,11
25	20,6	22,2	0,89	0,89
20	16,3	18,0	0,90	0,64
15	12,8	13,5	0,90	0,47
10	8,5	8,7	0,86	0,27
5	4,1	4,5	0,88	0,14

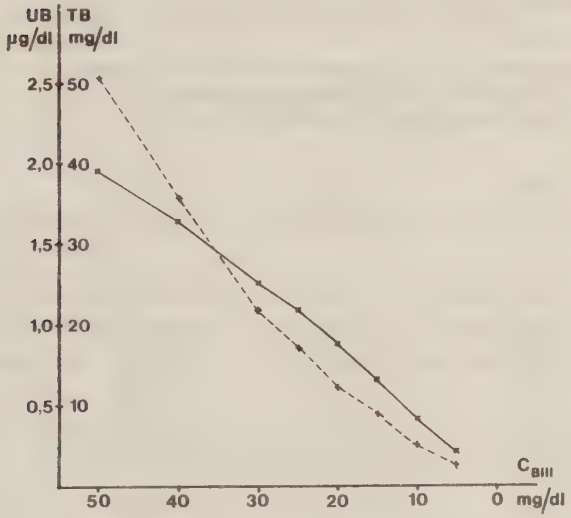

Abb.3: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard
- 5% Albumin als Verdünnungsmittel
(20% Albumin, verdünnt mit 0,9% NaCl)
(×——× TB, +- - - - +UB)

Wiederum fallen BA und TB von Ausgangswerten, die mit den vorherigen Versuchen nahezu übereinstimmen, fast linear auf vergleichbare Endwerte ab.
Gegensätzlich verhält sich UB. Von einem nahezu identischen

Ausgangswert ist schon auf Verdünnungsstufe 2 ein deutlicher Abfall festzustellen, der sich fortsetzt und bei hyperbelähnlichem Kurvenverlauf zu einem Endwert führt, der lediglich ca. 1/4 der Höhe der Endwerte aus den beiden ersten Versuchsreihen ausmacht.

Wird eine Albuminlösung hergestellt, bei der aqua dest. im gleichen Mischungsverhältnis wie in Versuchsreihe 3 zugesetzt wird, so ergibt sich hinsichtlich TB und BA kein anderer Kurvenverlauf als in der vorherigen Versuchsreihe (Vgl. Tab.4 und Abb. 4). UB zeigt ebenfalls ein ähnliches Verhalten wie im vorherigen Versuch, doch ist hier der Abfall zwischen Stufe 1 und 2 noch ausgeprägter, so daß die Kurve noch ausgesprochenere Hyperbelfiguration annimmt. Von Verdünnungsstufe 7 an variieren die Werte nur noch geringfügig.

Tab.4: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard - 5%iges Albumin als Verdünnungsmittel (20% Albumin, verdünnt mit aqua dest.)

vorgelegte Bilirubinkonzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
50	>30	38,8	2,23
40	25,6	27,4	1,11
30	23,3	25,3	1,07
25	21,8	23,3	0,86
20	15,4	16,5	0,58
15	11,6	12,2	0,40
10	8,3	8,5	0,28
5	4,2	4,5	0,14

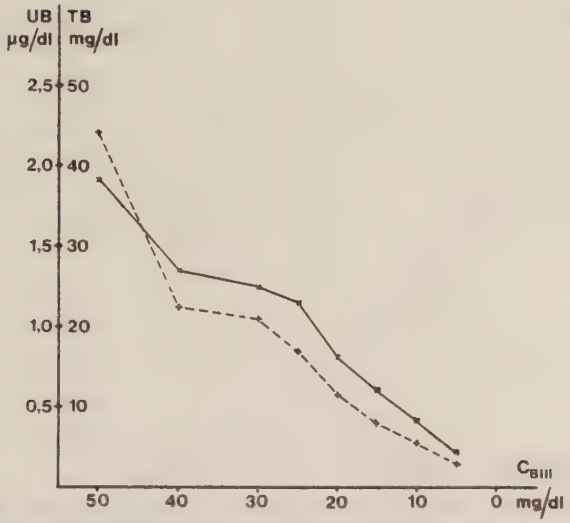

Abb.4: Verdünnungsreihe mit einem Bilirubinstandard - 5%iges Albumin als Verdünnungsmittel (20% Albumin, verdünnt mit aqua dest.) (*——*TB, +- - - -+UB)

- Standzeit der Verdünnungsansätze und Bilirubinwerte

Der Einfluß unterschiedlich langer Standzeiten der Verdünnungsreihen mit 5%igem Albumin als Lösungsmittel bis zur Bestimmung von TB und UB veranschaulichen die Tab./Abb. 5a-c.

Tab.5: Verdünnungsreihen mit 3 Ansätzen (5%iges Albumin als Lösungsmittel) unterschiedlicher Standzeiten

a) Ansatz I, Standzeit: 3-10 Minuten

vorgelegte Bilirubin-konzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
50	nicht	38,2	2,54
40	durch-	31,6	1,67
30	ge	24,4	1,10
25	führt	21,0	0,87
20		17,0	0,66
15		12,7	0,40
10		8,7	0,29
5		4,6	0,14

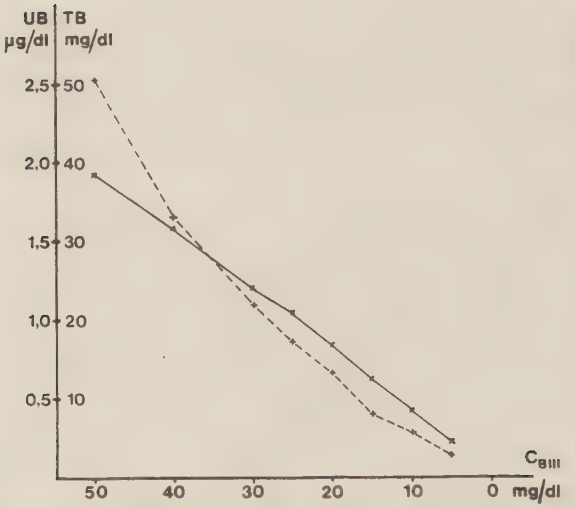

Abb.5a: Verdünnungsreihe mit 5%igem Albumin als Lösungsmittel, Standzeit: 3-10 Minuten, (×——× TB, +- - - + UB)

b) Ansatz II, Standzeit: 2,5 Stunden

vorgelegte Bilirubinkonzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
50	> 30	38,2	2,39
40	> 30	33,7	1,92
30	22,8	25,6	1,31
25	19,6	21,2	0,94
20	15,1	16,8	0,67
15	10,6	11,5	0,40
10	7,7	8,1	0,30
5	3,6	4,8	0,12

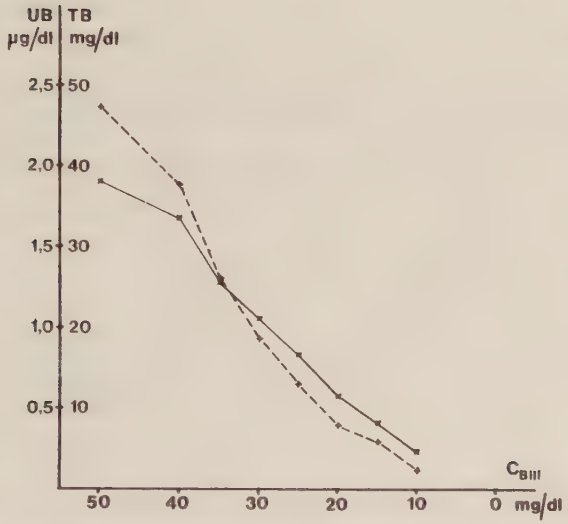

Abb.5b: Verdünnungsreihe mit 5%igem Albumin als Lösungsmittel, Standzeit: 2,5 Stunden, (*——*TB, +– – –+ UB)

c) Ansatz III, Standzeit: 20,5 Stunden

vorgelegte Bilirubin-konzentration[mg/dl]	BA [mg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
50	>30	39,1	2,33
40	28,6	33,5	1,57
30	22,8	26,4	1,05
25	18,9	21,7	0,79
20	15,8	17,4	0,57
15	10,6	11,3	0,33
10	7,7	8,4	0,26
5	4,1	4,6	0,13

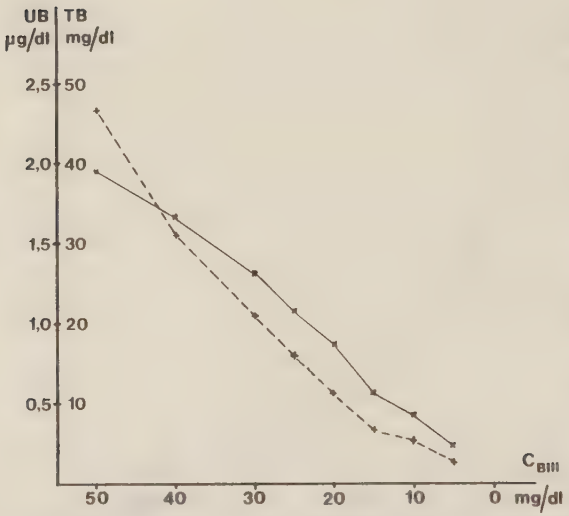

Abb.5c: Verdünnungsreihe mit 5%igem Albumin als Lösungsmittel, Standzeit: 20,5 Stunden, (*——*TB, +- - - -+UB)

Bei nahezu identischen TB-Ausgangswerten ist in allen drei Ansätzen ein linearer Rückgang (Abweichungen ± 1% vom Mittelwert 38,5mg/dl) auf Endwerte festzustellen, die betragsmäßig in etwa den Werten der vorhergehenden Versuche entsprechen.
Bei UB differieren die Ausgangswerte stärker (± 4% vom Mittelwert 2,42µg/dl). In allen drei Ansätzen sind Abnahmen festzustellen. Der Abfall bis zur Verdünnungsstufe 4 ist unterschiedlich. Am langsamsten fällt dieser bei Ansatz II aus. Bei den Ansätzen I und III hat die Kurve Hyperbelfiguration.

3.1.2. Verdünnungsreihen der Medikamente in Rattenserum

Einen Überblick über die Konzentrationen der Medikamente und die gefundenen Werte von TB und UB auf den einzelnen Verdünnungsstufen geben die Tab./Abb.6-9.

- Mabribon^{R}

Tab.6: Unterschiedliche Madribonkonzentrationen in gepooltem Rattenserum, (225µl Serum, 25µl Medikament)

Verdünnungsstufe	Medikamentenkonzentration im Serum [µg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
H_2O	-	9,0	1,52
5	14	8,75	1,52
4	57	8,5	1,59
3	225	8,4	1,62
2	900	8,3	1,73
1	3600	7,6	1,78

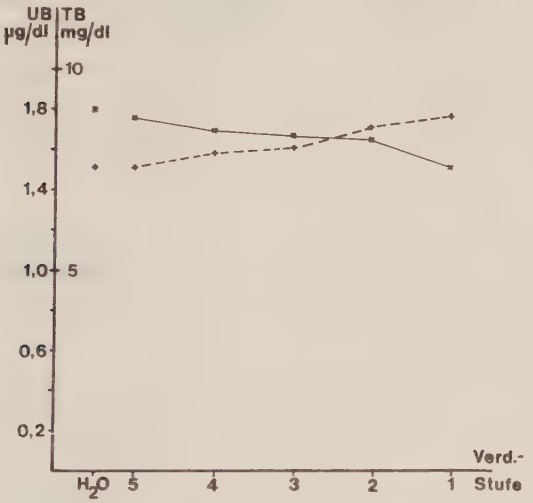

Abb.6: Unterschiedliche Madribonkonzentrationen in gepooltem Rattenserum, (225µl Serum, 25µl Medikament) (×——× TB, +– – –+ UB)

Wie aus Tab.6 hervorgeht, sinkt TB mit steigender Medikamentenkonzentration im Serum. Der Abfall von 8,8mg/dl auf 7,7mg/dl ist diskret, aber kontinuierlich. Demgegenüber nimmt UB mit steigender Medikamentenkonzentration von 1,52µg/dl auf 1,78µg/dl zu.

- Bucolome^{R}

Bei der in-vitro-Applikation von unterschiedlichen Bucolomekonzentrationen fällt TB von 4,3mg/dl auf 3,7mg/dl. Der Abfall setzt erst auf Verdünnungsstufe 3 ein. Invers zu dieser Bewegung ist das Verhalten von UB: Von 0,3µg/dl auf 0,96µg/dl auf der Stufe mit der höchsten Konzentration.

Tab.7: Unterschiedliche Bucolomekonzentrationen in gepooltem Rattenserum (50µl Serum, 25µl Medikament)

Verdünnungsstufe	Medikamentenkonzentration im Serum [µg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
H_2O	-	4,4	0,28
5	104	4,3	0,30
4	208	4,4	0,38
3	415	4,2	0,50
2	830	4,0	0,75
1	1660	3,7	0,96

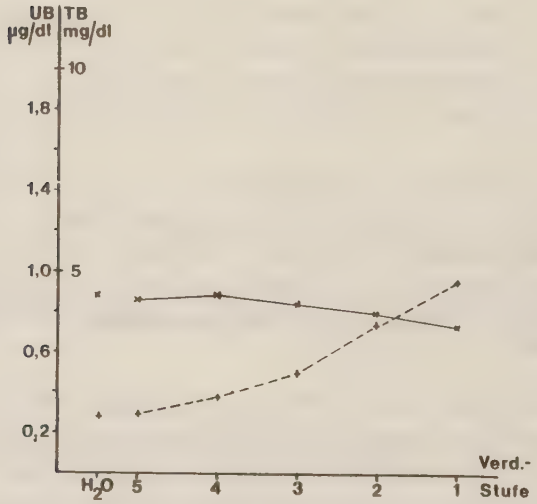

Abb.7: Unterschiedliche Bucolomekonzentrationen in gepooltem Rattenserum (50µl Serum, 25µl Medikament)
(*———*TB, +– – –+UB)

- Coffein-Na-Benzoat

Die Verabreichung dieses Medikaments (vgl. Tab./Abb. 8) führt nur zu einem Abfall von TB von 7,4mg/dl auf 7,1mg/dl., wobei dies erst ab Verdünnungsstufe 3 feststellbar ist. Bei der gleichen Verdünnungstufe verzeichnet UB einen Anstieg von 1,34µg/dl auf 1,48µg/dl.

Tab.8: Unterschiedliche Coff.-Na-Benzoat-Konzentrationen in gepooltem Rattenserum (225µl Serum, 25µl Medikament)

Verdünnungsstufe	Medikamentenkonzentration im Serum [µg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
H_2O	-	7,35	1,32
5	337	7,35	1,34
4	675	7,35	1,34
3	1250	7,25	1,42
2	2500	7,15	1,42
1	5000	7,05	1,48

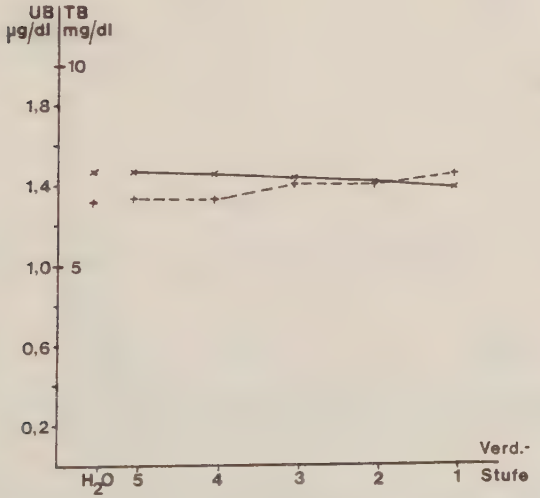

Abb.8: Unterschiedliche Coff.-Na-Benzoat-Konzentrationen in gepooltem Rattenserum, (225µl Serum, 25µl Medikament) (×——×TB, +– – –+UB)

Bei allen drei Medikamenten ist mithin - in unterschiedli-

chem Ausmaß - ein Absinken von TB festzustellen. Eine gegensinnige Tendenz ist bei UB zu verzeichen.

3.1.3. Verdünnungsreihen der Medikamente in Kinderserum

Die Wirkung unterschiedlicher Medikamentenkonzentrationen auf TB und UB in einem Kinderserum wird in den Tab./Abb. 9-11 dargestellt.

- Madribon^{R}

Tab.9: Unterschiedliche Madribonkonzentrationen in einem Kinderserum (225µl Serum, 25µl Medikament)

Verdünnungsstufe	Medikamentenkonzentration im Serum [µg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
H_2O	-	17,35	0,50
5	14	17,20	0,57
4	57	17,05	0,64
3	225	17,15	1,08
2	900	16,90	2,86
1	3600	16,55	3,19

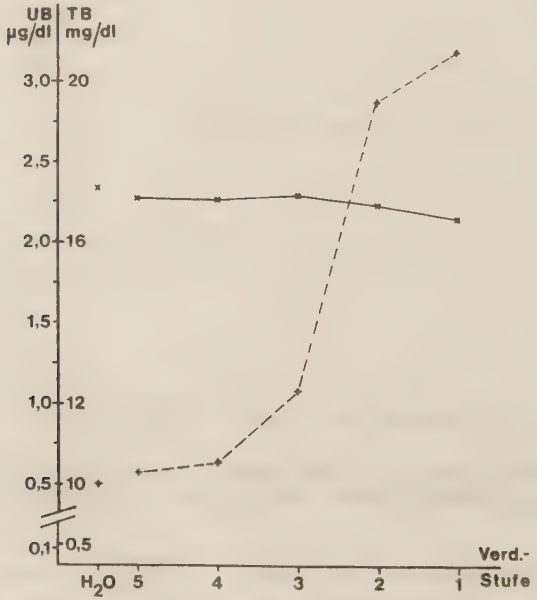

Abb.9: Unterschiedliche Madribonkonzentrationen in einem Kinderserum (225µl Serum, 25µl Medikament)
(×——× TB, +- - - + UB)

Ein geringer Abfall von TB wird erst deutlich auf den Stufen höchster Medikamentenkonzentration. Hingegen ist bei UB eine stufenweise Zunahme festzustellen. Der Wert der höchsten Medikamentenkonzentration beträgt etwa das sechsfache des Wertes auf der kleinsten Verdünnungsstufe (3,19µg/dl gegenüber 0,57µg/dl).

- Bucolome^{R}

Tab.10: Unterschiedliche Bucolomekonzentrationen in einem Kinderserum (50µg Serum, 25µg Medikament)

Verdünnungsstufe	Medikamentenkonzentration im Serum [µg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
H_2O	-	12,1	0,39
5	104	12,1	0,42
4	208	11,6	0,43
3	415	11,4	0,49
2	830	10,4	0,56
1	1660	9,8	0,88

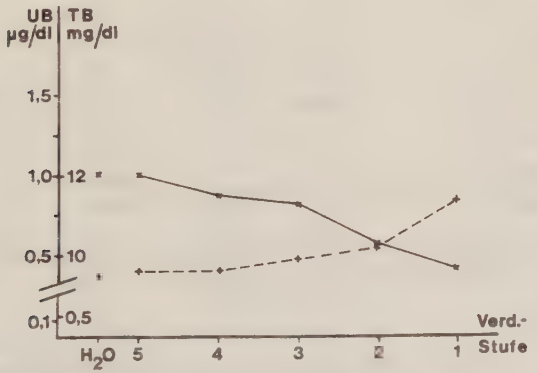

Abb.10: Unterschiedliche Bucolomekonzentrationen in einem Kinderserum (50µg Serum, 25µg Medikament)
(*——*TB, +- - -+UB)

TB sinkt von 12,1mg/dl auf 9,8mg/dl. UB nimmt von 0,42µg/dl auf etwa den doppelten Wert (0,88µg/dl) zu.

- Coffein-Na-Benzoat

Tab.11: Unterschiedliche Coffein-Na-Benzoat-Konzentrationen in einem Kinderserum

Verdünnungsstufe	Medikamentenkonzentration im Serum [µg/dl]	TB [mg/dl]	UB [µg/dl]
H_2O	-	16,55	0,41
5	337	16,35	0,46
4	675	15,40	0,53
3	1250	15,25	0,57
2	2500	14,35	0,63
1	5000	14,30	0,87

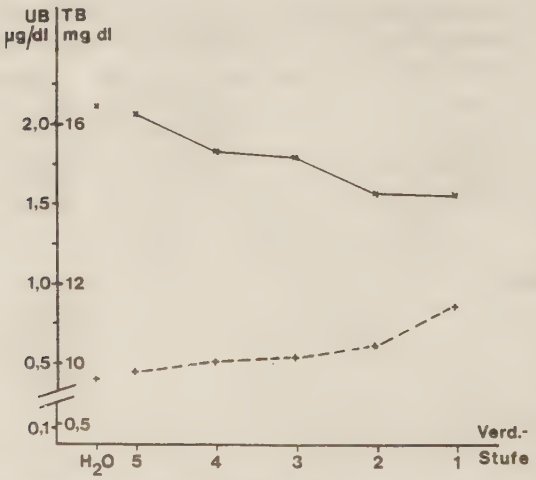

Abb.11: Unterschiedliche Coffein-Na-Benzoat-Konzentrationen in einem Kinderserum, (×——× TB, +– – –+ UB)

Coffein-Na-Benzoat führt zu einem Absinken von TB von 16,4mg/dl auf 14,3mg/dl. UB steigt von 0,46µg/dl auf knapp den doppelten Wert von 0,46µg/dl auf 0,87µg/dl.

Die Applikation der Medikamente führt zu einem Absinken der TB-Werte, während hinsichtlich des UB ein Anstieg zu verzeichnen ist.

3.2. In-vivo-Versuche

3.2.1. Bilirubin und Alter der Tiere

Den Zusammenhang zwischen Bilirubinwerten (TB und UB) und dem Alter von 84 Ratten, die zwischen 3 und 96 Tage alt waren, spiegeln Tab./Abb. 12 wider.

Tab.12: Bilirubinwerte und Alter bei 84 Ratten

Alter [d]	Anzahl der Tiere	TB $\bar{x}$ [mg/dl]	TB s	UB $\bar{x}$ [µg/dl]	UB s
3	3	9,77	1,18	1,66	0,44
4	5	12,60	1.17	1,14	0,09
5	4	11,49	0,67	2,21	0,26
6	4	13,31	0,58	2,57	0,13
7	3	14,15	0,48	2,46	0,27
8	6	10,50	2,09	1,37	0,49
9	3	14,58	0,76	1,60	0,07
10	14	13,82	1,89	2,04	0,62
11	9	13,38	1,42	1,88	0,36
12	5	15,72	0,54	1,81	0,33
18	3	15,60	1,47	1,38	0,23
26	3	9,65	0,90	1,75	0,21
37	2	4,76	0,08	0,94	0,01
49	1	5,70	-	0,85	-
58	2	6,28	1,03	1,33	0,20
63	4	7,16	0,60	1,42	0,12
66	3	8,85	0,62	1,68	0,10
71	1	5,80	-	1,17	-
78	3	7,50	0,69	1,44	0,12
85	1	8,00	-	1,59	-
90	2	7,08	0,19	1,46	0,10
91	2	7,58	1,13	1,48	0,19
96	1	8,00	-	1,59	-
	Σ 84				

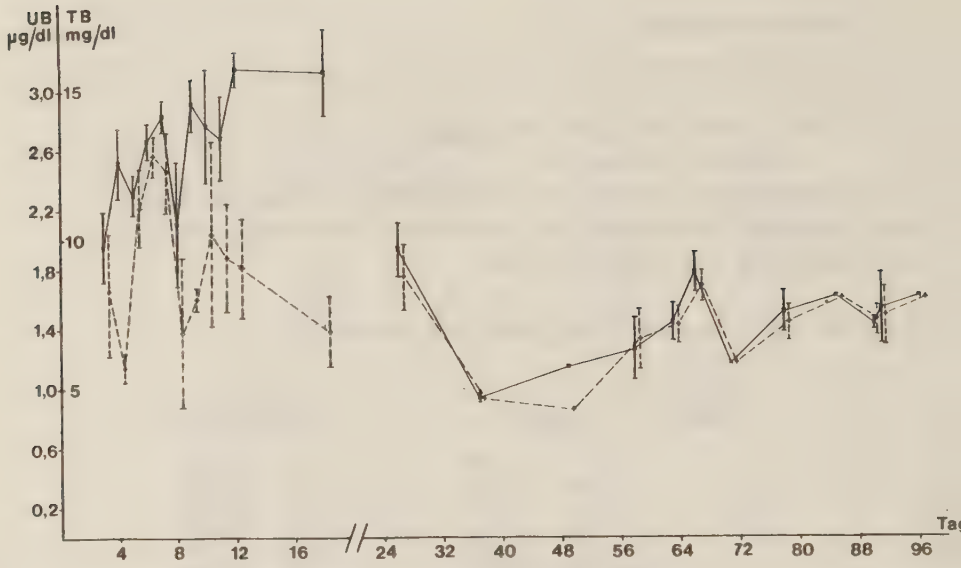

Abb.12: Bilirubinwerte und Alter bei 84 Ratten,
(*——* TB, +- - -+ UB)

Die jungen Tiere (3-12 Tage alt) weisen deutlich höhere TB-Konzentrationen als die 1-3 Monate alten auf. Wenn auch nicht linear, so scheint zwischen dem dritten und zwölften Tag ein Anstieg von TB stattzufinden. Die Zwischenzeit bis zum Alter von einem Monat ist nur durch 6 Tiere ausgewiesen. Während jedoch die Werte der 18 Tage alten Tiere auf dem gleichen Niveau wie die der 12 Tage alten liegen, fallen die der 26 Tage alten deutlich niedriger aus. Nach einem Monat pendeln sich dann die TB-Konzentration zwischen 5-8mg/dl ein. Bei UB liegen die Werte bis zum 12. Tag, teils erheblich, über denen der älteren Tiere, allerdings mit sehr großer Schwankungsbreite. Schon vom 8. Tag an scheint UB abzusinken. Nach dem 26. Tag folgt UB bis auf eine Ausnahme (49 Tage, n=1!) dem Kurvenverlauf von TB.

Die zur genaueren Verfolgung des Einflusses des Ernährungszustandes auf die Bilirubinkonzentrationen durchgeführten Versuche mit Ratten aus zwei Würfen, die getrennt worden wa-

ren, wobei die Wurfhälften über unterschiedliche Ernährungsbedingungen verfügten, erbrachten die in Tab./Abb. 13a und b ausgewiesenen Resultate.

Tab.13a: Bilirubinkonzentrationen bei unterschiedlich gut ernährten Jungtieren, Wurf 1

Alter	gut ernährte Tiere				schlecht ernährte Tiere			
	TB		UB		TB		UB	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
[d]	[mg/dl]		[µg/dl]		[mg/dl]		[µg/dl]	
4	11,0	0,84	0,88	0,25	12,4	1,70	1,62	0,41
6	12,2	2,14	1,29	0,23	10,5	2,61	1,52	0,79
8	13,6	0,58	1,33	0,24	12,2	0,38	1,74	0,31
10	14,8	1,97	1,09	0,32	12,6	0,61	1,43	0,18
12	14,6	0,46	1,07	0,19	14,6	0,47	1,40	0,29

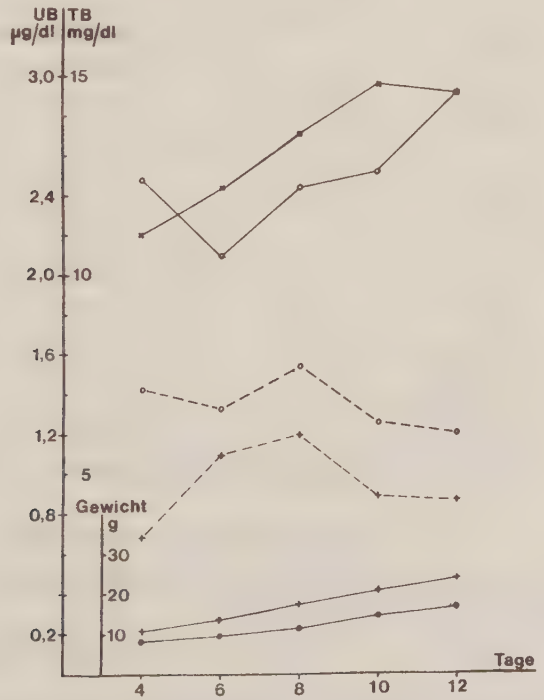

Abb.13a: Bilirubinkonzentrationen bei unterschiedlich gut ernährten Jungtieren, Wurf 1
(×——× TB, +- - -+ UB, ←——→ G, gut ernährte Tiere;
○——○ TB, ○- - -○ UB, ●——● G, schlecht ernährte Tiere)

Tab.13b: Bilirubinkonzentrationen bei unterschiedlich gut ernährten Jungtieren, Wurf 2

Alter	gut ernährte Tiere				schlecht ernährte Tiere			
	TB		UB		TB		UB	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
[d]	[mg/dl]		[µg/dl]		[mg/dl]		[µg/dl]	
5	12,5	0,63	0,91	0,89	11,4	1,64	2,16	0,49
7	12,9	1,25	1,76	0,38	11,1	1,24	2,09	0,32
9	12,4	0,89	1,42	0,21	11,7	0,73	1,96	0,41
12	12,6	1,63	1,56	0,51	12,6	0,47	1,90	0,22
13	12,8	1,13	1,28	0,28	13,4	1,42	1,60	0,35

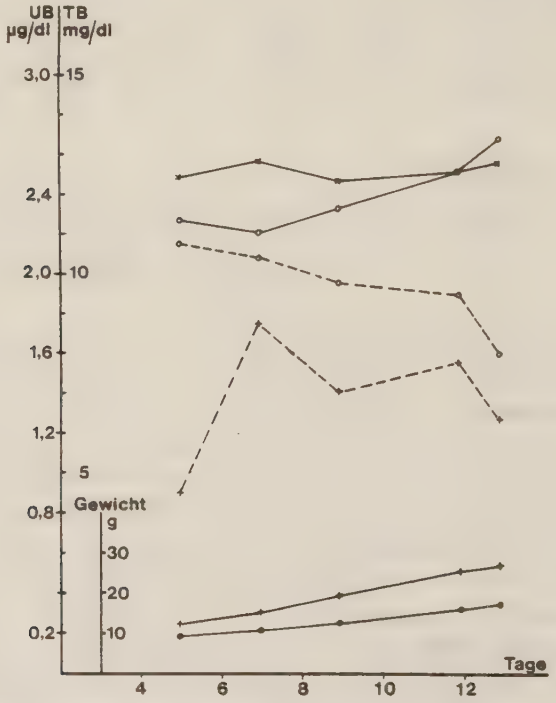

Abb.13b: Bilirubinkonzentrationen bei unterschiedlich gut ernährten Jungtieren, Wurf 2
(*——* TB, + - - - + UB, +——+ G, gut ernährte Tiere;
o——o TB, ∘ - - - ∘ UB, •——• G, schlecht ernährte Tiere)

In beiden Versuchen boten die besser ernährten Tiere gering höhere TB-Werte an nahezu sämtlichen Versuchstagen. Am 12. Tag bestand im Unterschied zu den Vortagen keine Differenz

mehr zwischen den Gruppen. Bei Wurf 2 sind die TB-Werte der gut ernährten Tiere praktisch konstant. Da bei den mageren Tieren jedoch ein Anstieg von TB stattfindet (von 11,4mg/dl auf 13,4 mg/dl) kreuzen sich die Kurven am 12. Tag.
Bei den UB-Werten liegen andere Verhältnisse vor: Hier weisen die mangelhaft ernährten Tiere deutlich höhere Werte auf. Unterschiedlich ist auch der Kurvenverlauf. Bei den gut ernährten Tieren steigt UB in beiden Würfen bis zum 7. bzw. 8. Tag an, um dann abzufallen. Dagegen ist bei den mangelhaft ernährten Wurfhälften keine eindeutige Tendenz auszumachen. Während in Versuch 1 die Werte relativ konstant bleiben, wobei sich allerdings der Höhepunkt am 8. Tag einstellt, liegen diese bei Versuch 2 bis zum 12. Tag auf einer Geraden mit geringer negativer Steigung (Abnahme zwischen 5. und 12. Tag: 0,26µg/dl). Am 13. Tag fällt UB bei beiden Wurfhälften aus Versuch 2 ab.
Schon zu Versuchsbeginn wiegen in beiden Würfen die schlechter ernährten Tiere ca. 3g weniger als die besser ernährten. In Wurf 1 nehmen die schlechter ernährten Tiere vom 1. bis letzten Versuchstag von durchschnittlich 8,14g auf 16,4g (= 201% des Ausgangswertes) zu, in Wurf 2 von 9,48g auf 17,55g (= 185% des Ausgangswertes). Bei den besser ernährten Tieren steigt das Gewicht in Wurf 1 von 10,94g auf 24,53g (= 224% des Ausgangswertes), in Wurf 2 von 12,51g auf 27,2g (= 217% des Ausgangswertes). Da somit die Gewichtszunahme bei den Tieren mit ungünstigen Ernaährungsbedingungen absolut und relativ niedriger ausfällt, vergrößert sich der Gewichtsabstand zu den Tieren mit Luxus-Säugemöglichkeiten.

3.2.2. Bilirubin nach Medikamentengabe

- Madribon^{R}

Tab./Abb.14 zeigen den Einfluß von 100mg/kg KG subkutan injiziertem Madribon^{R} auf die Bilirubinwerte von sieben 1-3

Monate alten Ratten.

Tab.14: Einfluß von 100mg/kg KG s.c. injiziertem Sulfadimethoxin auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 1-3 Monate alten Tieren)

Zeit nach Inj.	TB $\bar{x}$ [mg/dl]	TB s	TB $\bar{x}$ %	UB $\bar{x}$ [µg/dl]	UB s	UB $\bar{x}$ %
vorher	7,13	1,07	100	1,43	0,18	100
15 Min	2,34	0,39	32,8	0,47	0,08	32,9
30 Min	1,82	0,34	25,5	0,40	0,10	28,0
60 Min	1,67	0,29	23,4	0,43	0,06	30,1
24 Std	4,38	0,78	61,4	0,88	0,17	61,5

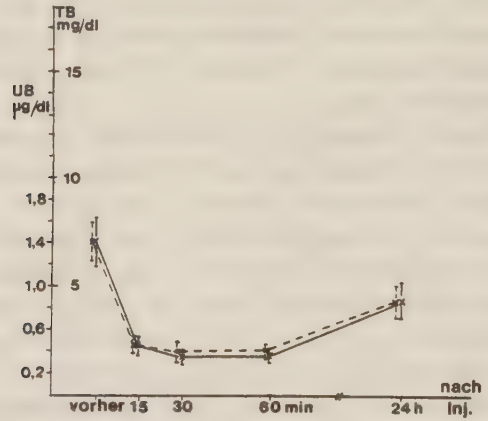

Abb.14: Einfluß von 100 mg/kg KG s.c. injiziertem Sulfadimethoxin auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 1-3 Monate alten Tieren); (×——×TB, +– – –+UB)

TB sinkt 15 Minuten nach Medikamentengabe von 7,13mg/dl auf 32,8% des Ausgangswertes. Nach 60 Minuten erreicht es mit 1,67mg/dl den tiefsten Wert. Nach 24 Stunden ist TB wieder angestiegen, liegt aber mit 4,38mg/dl noch immer um 38,6% unter dem Ausgangswert.

Der Kurvenverlauf von UB entspricht dem von TB. UB sinkt von 1,43µg/dl vor Medikamentengabe auf 0,47µg/dl (=32,9%) 15 Minuten nach Madribonapplikation. Die 30-Minuten(0,40µg/dl) und

60-Minuten-Werte (0,43µg/dl) liegen nur geringfügig niedriger. Der 24-Stunden-Wert liegt wieder höher, erreicht mit 0,88µg/dl aber nur 61,5% des Ausgangswertes.

Die bei gleicher Versuchsanordnung erhobenen Werte der Jungtiere sind in Tab./Abb.15 wiedergegeben.

Tab.15: Einfluß von 100mg/kg KG s.c. injiziertem Sulfadimethoxin auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 7-11 Tage alten Tieren)

Zeit nach Inj.	TB $\bar{x}$ [mg/dl]	TB s	TB $\bar{x}$ %	UB $\bar{x}$ [µg/dl]	UB s	UB $\bar{x}$ %
vorher	14,60	1,81	100	1,74	0,32	100
15 Min	6,16	0,40	42,2	0,73	0,50	42,0
30 Min	4,02	0,61	27,5	0,33	0,24	19,0
60 Min	3,83	0,73	26,2	0,32	0,28	18,4
24 Std*	5,04	0,84	34,5	0,35	0,07	20,1

* 2 Tiere gestorben

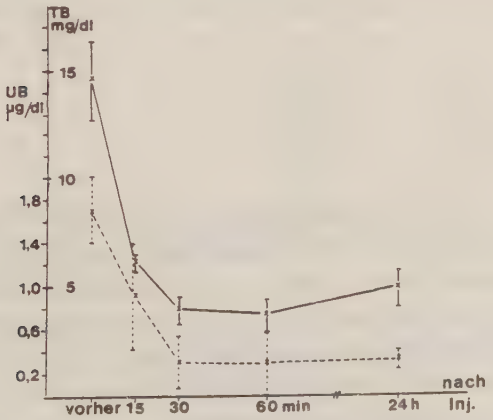

Abb.15 Einfluß von 100 mg/kg KG s.c. injiziertem Sulfadimethoxin auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 7-11 Tage alten Tieren); (*——* TB, +---+UB)

15 Minuten nach Medikamentenapplikation ist TB mit 6,16mg/dl auf 42,2% des Ausgangswertes (=14,7mg/dl) abgesunken. Nach 30

Minuten liegt es bei 4,02mg/dl und erreicht nach 60 Minuten - innerhalb der durchgeführten Messungen - den Tiefstwert mit 3,83mg/dl. 24 Stunden nach Verabreichung des Medikaments ist TB wieder auf 5,04mg/dl angestiegen, was 34,5% des Ausgangswertes entspricht.
Bei UB ist ebenfalls ein dem TB entsprechender Kurvenverlauf zu beobachten. Nach 15 Minuten ist UB von 1,74µg/dl auf 0,73µg/dl (=42%) abgefallen. Dieser Trend setzt sich bis zum 60-Minuten-Wert fort, der sich vom vorhergehenden nur in der zweiten Stelle hinter dem Komma (0,32µg/dl) unterscheidet. Nach 24 Stunden ist UB nur unwesentlich angestiegen (0,35µg/dl) und liegt um 79,9% unter dem Ausgangswert.

Beim Vergleich der Bilirubinwerte zwischen den beiden Altersgruppen (vgl. Tab.16) liegen die älteren Tiere hinsichtlich des TB zu allen Zeiten niedriger als die Jungtiere.

Tab. 16: Relationen von TB und UB bei zwei unterschiedlichen Altersgruppen von Ratten nach s.c. Injektion von Sulfadimethoxin zu verschiedenen Zeiten (Gruppe der 1-3 Monate alten Ratten gleich 1).

	TB	UB
vorher	1 : 2,06	1 : 1,22
15 Min	1 : 2,63	1 : 1,55
30 Min	1 : 2,21	1 : 0,83
60 Min	1 : 2,05	1 : 0,74
24 Std	1 : 1,15	1 : 0,40

Nach 24 Stunden ist die TB-Konzentration bei den älteren Tieren stärker in Richtung auf den Ausgangswert gestrebt, so daß sich der Wertabstand zwischen den beiden Gruppen verkleinert. Beim UB liegen die Konzentrationen bei den jüngeren Tieren zunächst höher; nach 30 Minuten kehrt sich das Verhältnis um. 24 Stunden nach Mabribon^{R}-Verabreichung ist bei den älteren Tieren ein relativ höheres UB nachweisbar.
In beiden Tiergruppen liegen UB und TB immer in einer bestimmten Relation vor, wie die weitgehend parallelen Kurvenverläufe von TB und UB und ein Vergleich der Prozentualwerte zum jeweiligen Bestimmungszeitpunkt ausweisen.

Mit Sulfadimethoxin (100mg/kg KG s.c.) wurden zwei Versuche durchgeführt zur KLärung der Frage, ab welchem Zeitpunkt die Veränderungen von TB und UB im Serum nachweisbar sind. Zwei Gruppen von Tieren wurde schon nach 3-5 Minuten Blut entnommen. Dabei ergeben sich die in Tab.17 aufgeführten Werte.

Tab.17: Veränderungen von TB und UB bei zwei unterschiedlichen Altersgruppen 3-5 Minuten nach s.c. Injektion von Sulfadimethoxin (Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf 5-10 Tage und vier 1-2 Monate alten Tieren)

	5-10 Tage alt				1-2 Monate alt			
Zeit	TB		UB		TB		UB	
nach	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Inj.	[mg/dl]		[µg/dl]		[mg/dl		[µg/dl]	
vorher	12,06	1,78	1,94	0,88	6,60	1,65	1,08	0,49
3-5 Min	3,44	0,40	0,22	0,04	2,00	0,42	0,26	0,07

Es zeigt sich, daß in beiden Gruppen schon nach dieser relativ kurzen Zeitspanne zwischen Medikamentenapplikation und Blutentnahme Veränderungen von TB und UB in den bereits beschriebenen Richtungen nachweisbar sind. Durch das Medikament aus der Albuminbindung freigesetztes UB läßt sich in der gewählten Versuchsanordnung im Serum nicht fassen.

- Bucolome^{R}

Die Veränderungen der TB- und UB-Serum-Konzentrationen vor und nach einer s.c. Injektion von 50mg/kg KG Bucolome^{R} sind wiedergegeben in Tab.18.

Tab.18: Einfluß von 50mg/kg KG s.c. injiziertem Bucolome^{R} auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 2-3 Monate alten Tieren)

Zeit	TB			UB		
nach	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$
Inj.	[mg/dl]		%	[µg/dl]		%
vorher	7,34	0,67	100	1,43	0,12	100
15 Min	4,20	0,28	57,2	0,85	0,07	59,4
30 Min	3,48	0,39	47,4	0,70	0,10	49,0
60 Min	3,54	0,33	48,2	0,69	0,11	48,3
24 Std	5,42	0,57	71,4	1,03	0,10	72,0

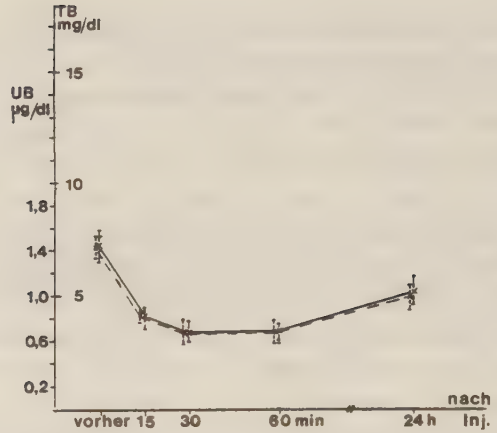

Abb. 16: Einfluß von 50mg/kg KG s.c. injiziertem Bucolome^{R} auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 2-3 Monate alten Tieren);(*——*TB, +---+ UB)

In der Gruppe der sieben 2-3 Monate alten Ratten fiel TB von 7,34mg/dl auf 4,2mg/dl nach 15 Minuten. Nach 30 Minuten erreicht die Serum-Konzentration mit 3,48mg/dl ihren Tiefststand. Der 60-Minuten-Wert liegt geringfügig darüber. Nach 24 Stunden ist TB wieder angestiegen auf 71,4% des Ausgangswertes.

Der Kurvenverlauf von UB geht parallel zu dem von TB. Nach einem Abfall von 1,43µg/dl auf 0,85µg/dl nach 15 Minuten sinkt die UB-Konzentration weiter auf 0,70µg/dl zum 30-Minuten-Zeitpunkt. Diese Konzentration hat sich nach 60 Minuten praktisch nicht verändert. Nach 24 Stunden ist UB auf 1,03µg/dl angestiegen und erreicht damit 72,0% des Ausgangswertes. Die Standardabweichungen aller Werte schwanken zwischen 0,07 (15 Minuten) und 0,12µg/dl (Ausgangswert).

Die Werte für die Jungtiere sind Tab.19 bzw. Abb.17 zu entnehmen.

Tab.19: Einfluß von 50mg/kg KG s.c. injiziertem Bucolome^{R} auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 7-11 Tage alten Tieren)

Zeit nach Inj.	TB $\bar{x}$ [mg/dl]	TB s	TB $\bar{x}$ %	UB $\bar{x}$ [µg/dl]	UB s	UB $\bar{x}$ %
vorher	14,44	1,13	100	1,63	0,38	100
15 Min	5,77	1,47	40,0	0,50	0,36	30,7
30 Min	3,97	1,42	27,5	0,37	0,34	22,7
60 Min	3,76	1,50	26,0	0,28	0,29	17,2
24 Std*	10,34	5,18	71,6	1,16	0,41	71,2

*3 Tiere gestorben

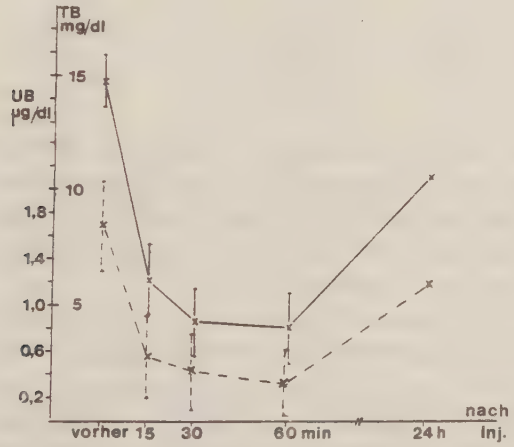

Abb.17: Einfluß von 50mg/kg KG s.c. injiziertem Bucolome^{R} auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben 7-11 Tage alten Tieren); (×———× TB, +– – –+ UB)

Bei den sieben 8-11 Tage alten Ratten liegt der TB-Ausgangswert bei 14,4mg/dl. 15 Minuten nach Medikamentenapplikation ist TB auf 5,77mg/dl (=40% vom Ausgangswert) gefallen, weitere 15 Minuten später auf 3,97mg/dl. Zum 60-Minuten-Zeitpunkt liegt die TB-Konzentration mit 3,76mg/dl am niedrigsten. Nach 24 Stunden ist sie auf 10,43mg/dl (=72% des Ausgangswertes) angestiegen. In diesen Wert gingen nur die Rohdaten von drei Tieren ein, weil die restlichen zwischenzeitlich gestorben waren.

Die UB-Kurve weist eine ähnliche Verlaufsform auf. Vom Ausgangswert 1,63µg/dl sinkt UB auf 0,50µg/dl 15 Minuten nach Medikamentengabe ab. Sie flacht dann ab und erreicht nach 45 Minuten ihren Tiefstwert von 0,28µg/dl. Nach 24 Stunden weisen die 3 Tiere, die den Versuch überlebten, einen mittleren Wert von 1,16µg/dl auf (71,2% vom Ausgangswert).

Tab.20: Relationen von TB und UB bei zwei unterschiedlichen Altersgruppen von Ratten nach s.c. Injektion von Bucolome^{R} zu verschiedenen Zeiten (Gruppe der 1-3 Monate alten Ratten gleich 1).

	TB	UB
vorher	1 : 1,97	1 : 1,14
15 Min	1 : 1,37	1 : 0,59
30 Min	1 : 1,14	1 : 0,53
60 Min	1 : 1,06	1 : 0,41
24 Std	1 : 1,97	1 : 1,13

Im Vergleich zu den älteren Tieren liegen die absoluten TB-Konzentrationen bei den jüngeren Tieren höher. Da bei den mittleren Werten das Verhältnis jedoch nur wenig vom 1 : 1 -Verhältnis abweicht, nimmt die Kurve bei den Jungtieren einen ausgeprägteren U-förmigen Verlauf.
Hinsichtlich des UB unterscheiden sich die beiden Tiergruppen am deutlichsten in den mittleren Werten, die bei den jüngeren Tieren nur etwa halb so hoch wie bei den älteren Tieren liegen. Wie bereits festgestellt, besteht in beiden Versuchsreihen zwischen TB und UB eine relativ konstante Relation, abzulesen an den parallelen Kurvenverläufen. Der Relationskoeffizient ist bei den älteren Tieren größer.

- Coffein-Na-Benzoat

Bei subkutaner Injektion von 200mg/kg KG Coffein-Na-Benzoat ergeben sich die in Tab. 21 aufgeführten Veränderungen der Serum-Konzentrationen von TB und UB bei 1-2 Monate alten Ratten. Die gleiche Dosis führte bei den Jungtieren zu akuter Letalität. Deshalb wurde bei ihnen die Dosis um die Hälfte reduziert.

Tab.21: Einfluß von 200mg/kg KG s.c. injiziertem Coffein-Na-Benzoat auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs 1-2- Monate alten Tieren)

Zeit nach Inj.	TB $\bar{x}$ [mg/dl]	TB s	TB $\bar{x}$ %	UB $\bar{x}$ [µg/dl]	UB s	UB $\bar{x}$ %
vorher	6,95	2,07	100	1,30	0,41	100
15 Min	6,28	2,09	90,4	1,18	0,38	90,8
30 Min	5,48	1,88	78,8	1,05	0,40	80,8
60 Min	6,27	2,37	90,2	1,14	0,54	87,7
24 Std	7,99	1,44	115,0	1,35	0,10	103,8

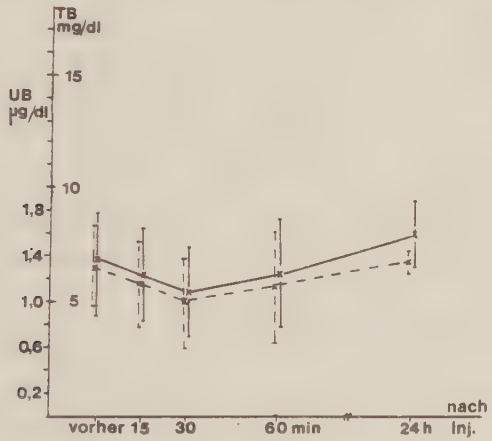

Abb.18: Einfluß von 200mg/kg KG s.c. injiziertem Coffein-Na-Benzoat auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs 1-2 Monate alten Tieren); (×——× TB, + – – – + UB)

Vom Ausgangswert sinkt TB auf einen Tiefstwert von 5,48mg/dl 30 Minuten nach Medikamentenapplikation. Nach 60 Minuten ist TB wieder angestiegen. Der 24-Stunden-Wert liegt mit 7,99mg/dl deutlich über dem Ausgangswert.
Die prozentualen Verschiebungen verhalten sich gleichsinnig zu denen von TB.

Tab.22: Einfluß von 100mg/kg KG s.c. injiziertem Coffein-Na-Benzoat auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs 10-11 Tage alten Tieren)

Zeit nach Inj.	TB $\bar{x}$ [mg/dl]	TB s	TB $\bar{x}$ %	UB $\bar{x}$ [µg/dl]	UB s	UB $\bar{x}$ %
vorher	14,80	1,20	100	2,36	0,52	100
15 Min	13,84	1,30	93,5	2,04	0,58	86,4
30 Min	11,71	1,37	79,1	1,93	0,29	81,8
60 Min	11,55	1,21	78,0	1,73	0,32	73,3
24 Std	19,67	1,16	132,9	2,86	0,70	121,2

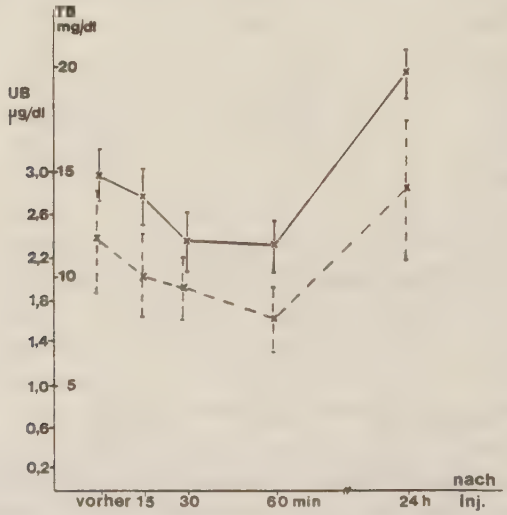

Abb. 19: Einfluß von 100mg/kg KG s.c. injiziertem Coffein-Na-Benzoat auf TB und UB (Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs 10-11 Tage alten Tieren); (×——× TB, +– – –+ UB)

Bei den 10-11 Tage alten Tieren (vgl.Tab.22) ist TB 30 Minuten nach Medikamentengabe von 14,8mg/dl auf 11,71mg/dl gesunken und vermindert sich nach 60 Minuten nochmals um 0,16mg/dl. Der 24-Stunden-Wert liegt mit 19,67mg/dl um ca. 33% über dem Ausgangswert.

Die Kurve von UB zeigt insgesamt einen dem TB ähnlichen Verlauf: Nach Absinken von 2,36µg/dl auf 1,93µg/dl 30 Minuten

nach Medikamentengabe fällt es allerdings fast linear ab auf 1,73µg/dl zum 60-Minuten-Zeitpunkt. Der Anstieg nach 24 Stunden liegt mit 2,86µg/dl um 21% höher als der Ausgangswert. Wiederum weisen die jüngeren Tiere höhere Serum-Konzentrationen an TB als die älteren Tiere auf. Die Verhältnisse betragen im einzelnen:

Tab. 23: Relationen von TB und UB bei zwei unterschiedlichen Altersgruppen von Ratten nach s.c. Injektion von Coffein-Na-Benzoat zu verschiedenen Zeiten (Gruppe der 1-3 Monate alten Ratten gleich 1).

	TB	UB
vorher	1 : 2,13	1 : 1,82
15 Min	1 : 2,20	1 : 1,73
30 Min	1 : 2,14	1 : 1,84
60 Min	1 : 1,84	1 : 1,52
24 Std	1 : 2,46	1 : 2,12

Während bei den ersten drei Werten das Verhältnis nahezu konstant bleibt, weichen die beiden letzten in gegensätzliche Richtung ab.

UB liegt generell bei den Jungtieren in höherer Konzentration als bei den älteren Tieren vor, erreicht aber nicht eine den älteren Tieren vergleichbare relative Höhe, wie aus dem geringeren Relationskoeffizienten hervorgeht.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Versuchsreihen durchgeführt worden, deren Wertigkeit hinsichtlich der Untersuchungsziele unterschiedlich war. Im Zentrum der Arbeit stand erstens die Frage nach dem in-vivo-Verhalten des freien Bilirubins nach Medikamentengabe. Zum Zweiten sollte geprüft werden, inwieweit sich bereits vorliegende Ergebnisse mit dem von uns eingesetzten Bestimmungsverfahren reproduzieren ließen.
Die Ergebnisse der in-vitro-Versuche zum Verhalten von TB in unterschiedlichen Konzentrationen (Verdünnungsreihen) eines Bilirubinstandards sind kohärent und tendenziell identisch bei allen drei benutzten Lösungsmitteln: Sowohl bei 0,9% NaCl, bei aqua dest., als auch bei einer 5%-igen Albuminlösung als Lösungsmittel nimmt TB linear, entsprechend der abnehmenden vorgelegten Bilirubinkonzentration , ab. Nichts anderes war nach der Versuchsanordnung zu erwarten, weil TB die Gesamtmenge des auf der jeweiligen Verdünnungsstufe vorgelegten Bilirubins ist. Die empirisch gewonnenen Daten für TB betragen jedoch nur etwa 86% der eingewogenen Menge Bilirubin. Ob die Ursache für diesen systematischen Fehler im unpräzisen internen Standard des Gerätes oder in dem von mir verwendeten, möglicherweise nicht ganz reinem Bilirubin liegt, kann wegen des Verzichts auf den Einsatz von Standardisierungsproben nicht angegeben werden.
Für UB lassen sich in Abhängigkeit vom Lösungsmittel zwei unterschiedliche Kurvenverlaufstypen unterscheiden.
Bei Verdünnung mit 0,9% NaCL (vgl.Tab. 1a) ist UB, in Übereinstimmung mit den errechneten Werten, konstant. Der gemessene UB-Wert liegt aber deutlich zu niedrig. Als Ursache kommen zwei Möglichkeiten in Betracht. Entweder ist die in Anlehnung an Brodersen (10) veranschlagte Bindungskonstante zu hoch ($1{,}2 \cdot 10^7$ l/mol liefert eine deutlich bessere Übereinstimmung), oder es muß angenommen werden, daß die Löslichkeit des freien Bilirubins überschritten wird. Nach Brodersen (11) beträgt die Löslichkeit des freien Bilirubins bei pH < 7,9 weni-

ger als 2,5ul/dl. Auch der Abfall des UB bei hohen Verdünnungen könnte durch die dann eintretende Abnahme der Albumin-Pufferkapazität leicht erklärt werden. Bei Verdünnung mit 5%-igem Albumin fällt UB kurvenparallel zu TB ab; unterhalb 30mg/dl zeigen die Meßwerte sehr gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten. Die schlechte Übereinstimmung für hohe Konzentrationen läßt sich wiederum durch eine geringe Löslichkeit von UB erklären.

Bei den in-vitro-Versuchen mit unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen, die einem gepoolten Rattenserum zugesetzt wurden, sinkt erwartungsgemäß TB bei den drei eingesetzten Medikamenten ab. Dieser Abfall fällt unterschiedlich aus, am diskretesten ist er bei Coffein-Na-Benzoat. Der für Madribon^{R} gefundene TB-Abfall auf Verdünnungsstufe 1 fällt mit 0,25mg/dl betragsmäßig zwar geringer als bei Schweitzer (46) aus, der einen Wert von 0,6mg/dl bei ähnlicher Medikamentenkonzentration (10µg/dl) mitteilt. Da Schweitzer aber auf die Angabe der Absolutkonzentration von TB verzichtet und er überdies Serum von 9-11 Tage alten Ratten verwendete - unsere Tiere waren älter -, erscheint ein numerischer Vergleich der Beträge wenig sinnvoll. Für die beiden anderen Medikamente liegen, soweit mir bekannt, keine Literaturangaben vor.

Im Gegensatz zu dem Absinken von TB zeigt UB einheitlich eine gegensinnige Veränderungsrichtung. Dieser Anstieg ist bei Coffein-Na-Benzoat am niedrigsten. Für dieses Medikament konnte Schiff et. al. (41) ebenfalls einen Anstieg von UB im SGF-Test nachweisen.

Die unterschiedlich steilen Kurvenverläufe bei den einzelnen Medikamenten waren bei der Anordnung der Versuche zu erwarten. Von vorneherein stand fest, daß eine Standardisierung hinsichtlich der einzusetzenden Wirkstoffmenge, womöglich auf jeder Verdünnungsstufe, aus praktisch-technischen Gründen im Labor des KAV nicht durchführbar war. Insofern ist es unzulässig, aus den Kurven die Affinität der Medikamente zur Bilirubinbindungsstelle herauslesen zu wollen, wie dies die relativ schwachen Veränderungen bei Coffein-Na-Benzoat suggerieren mögen. Für CoffeinNa-Benzoat ist im Vergleich zu Sulfadimetho-

xin zwar eine relativ niedrige Bindungskonstante in Bezug auf das Albumin bekannt (Brodersen (9)); für deren Bestimmung hätte es aber eines anderen Versuchsaufbaus bedurft, - was im Rahmen der vorgegebenen materiellen Arbeitsbedingungen nicht geleistet werden konnte. Meine Versuche zielten vielmehr lediglich darauf ab zu zeigen, daß sich TB und UB bei Medikamentenapplikation in vitro reziprok verhalten.
Wird bei sonst gleicher Versuchsanordnung statt mit Rattenserum mit einem Kinderserum gearbeitet, so sind die Ergebnisse prinzipiell kongruent zu den vorherigen Versuchen. Bei allen drei Medikamenten sinkt TB mit steigender Medikamentenkonzentration mehr oder weniger linear ab, UB steigt an. Differenzen ergeben sich im Vergleich zu den Versuchen mit Rattenserum hinsichtlich der Absolutwerte von TB und UB. So liegt TB bei dem Kinderserum deutlich höher als bei dem gepoolten Rattenserum. Dieser Tatbestand ergab sich aus den unterschiedlichen Ausgangswerten, weil im Versuchsaufbau darauf verzichtet worden war, Ansätze gleich hoher Bilirubinkonzentration herzustellen (Einzelheiten im methodischen Teil der Arbeit).
Hingegen ist der Anteil der freien Bilirubinfraktion bei dem Kinderserum niedriger als bei den Ratten. Dieser Befund könnte auf einer unterschiedlichen Affinität von Ratten- und Humanalbumin zum Bilirubin beruhen. Schmid et.al.(46) konnten zeigen, daß tatsächlich markante Unterschiede zwischen der Eiweißfraktion beider Spezies bestehen: Wurde menschliches und Ratten-Serum gleicher Bilirubin- und Albuminkonzentration in Lösungen mit Cholestyramin-Harz verbracht, das eine hohe Affinität zum Bilirubin aufweist, so war die bei menschlichem Serum an das Harz gebundene Menge Bilirubin weit niedriger als die bei dem Rattenserum. Demnach wäre auch in unserem Fall für das Rattenalbumin eine niedrigere Bilirubinbindungsaffinität anzunehmen. Eine tiefergehende Interpretation der Daten, die eine Gewichtung der Medikamente hinsichtlich ihres Bilirubinverdrängungspotentials einschlösse, ist aufgrund der unterschiedlich vorgelegten Medikamentenmengen nicht möglich. Festzuhalten ist jedoch, daß in den in-vitro-Versuchen umgekehrte Veränderungsrichtungen von TB und UB sowohl bei tierischen, als auch menschlichem Serum nachgewiesen werden konnten.

Der Abfall von TB steht in Einklang mit dem allgemein akzeptierten Konzept (z. B. Brodersen (7), (8), Wennberg et al. (50), Yeary u. Davis (56)) einer Konkurrenz von Bilirubin und bestimmten Medikamenten um die Bindungsstelle am Albumin. Die ausgewählten Medikamente führen zur Freisetzung von Bilirubin aus der Albuminbindung. Aufgrund der Unlöslichkeit des Bilirubins kommt es zu dessen Ausfall und damit zur Abnahme der im Plasma meßbaren Gesamtkonzentration. Demgegenüber steigt das freigesetzte, ungebundene Bilirubin an.
Die Auswertung der Untersuchung zum Zusammenhang zwischen dem Alter der Ratten und ihren Bilirubinkonzentrationen im Serum bestätigte bereits von Schutta und Johnson (45) und Korn (26) mitgeteilte Beobachtungen, daß jüngere (1-10 Tage alte) Tiere eine höhere Bilirubinkonzentration aufweisen als ältere (> 1 Monat). Schutta und Johnson geben für den 5.-7. Tag ein Gesamtbilirubin von 7mg% und für den 8.-10.Tag einen Wert von 8mg/% an. Korns Werte liegen mit 8,8lmg/dl $\pm$ 2,15 am 5.Tag und mit 10,14 mg/dl $\pm$ 1,8 am 10. Tag etwas höher. Mit 11,5mg/dl $\pm$ 0,67 am 5. Tag und 13,8mg/dl $\pm$ 1,9 am 10. Tag fallen die von mir gemessenen Werte zwar höher aus, stimmen aber insoweit überein, als ein gleichsinniger Anstieg des Bilirubins im Vergleichszeitraum stattfindet. Der Höhepunkt der Hyperbilirubinämie liegt laut Schutta und Johnson am 14.-16. Lebenstag. Gleichlautende Ergebnisse teilt Laniado (27) aus seinen Versuchen mit. Der Rückgang ist in meinen Versuchen erst am 26. Tag zu belegen, was daran liegt, daß Werte für die Zwischenzeit nicht erhoben wurden, weil Tiere dieses Alters nicht eindeutig der Gruppe der jungen bzw. erwachsenen Ratten zuzuordnen gewesen wären und somit für die anderen Versuche nicht in Betracht kamen. Von da an sind in Übereinstimmung mit der Literatur (45) konstante Werte zwischen 5-8 mg/dl zu verzeichnen, die dann im gesamten Erwachsenenalter gelten. Die von mir erhobenen Werte für UB liegen bis zum 12. Tag bis auf wenige Ausnahmen höher als zu den späteren Zeitpunkten und folgen somit im wesentlichen dem Kurvenverlauf von TB. Für freies Bilirubin liegen, soweit ich sehe, bisher keine numerischen Vergleichswerte in der Literatur vor. Jedoch konnten auch Korn

(26) und Schweitzer (46) bei jungen Ratten einen positiven Ausfall der SGF in einem höheren Prozentsatz beobachten als bei älteren. Als Erklärung für diese positive, jedoch nicht durchgängige Korrelation kann eine Überlagerung mehrerer unterschiedlicher Tendenzen angenommen werden, die womöglich synergistisch wirken: Die Höhe freien Bilirubins ist zum einen abhängig von der absoluten Bilirubinkonzentration, mit der es in einem Gleichgewicht steht (11). Zum anderen müssen zusätzliche Faktoren, wie Albuminmangel, Azidose, Mangelernährung/ Hunger hinzukommen (14),(25), die zu einem Anstieg freien Bilirubins führen und die für die relativ großen interindividuellen Schwankungen (59) verantwortlich sein dürften. Gerade bei den Jungtieren spielen diese Faktoren eine Rolle, sind in die Daten doch auch die unterschiedlich gut ernährten Würfe einbezogen. Zu den späteren Zeitpunkten, wenn die Gesamtbilirubin-Konzentration niedriger liegt und wenn die oben erwähnten Faktoren weniger wirksam sind, sinkt UB ab und die Relation von TB und UB ist verhältnismäßig stabil. Weiterhin ist von Bedeutung, daß die Albumin-Konzentration von jungen Ratten niedriger ist als die von ausgewachsenen. Eine Zunahme der Serum-Albuminkonzentration von der Geburt bis zum 25. Lebenstag ist für Gunn-Ratten von Schutta und Johnson (45) nachgewiesen worden. Sie fanden eine um 75% niedrigere Serum-Protein-Konzentration der ein Tag alten Ratte gegenüber der 4 Wochen alten. Auch Korn (26) hat eine Zunahme des Gesamteiweißes im Serum von 5-9 Tage alten Ratten beschrieben. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche absolute und relative Höhe von UB bietet sich unter Rekurs auf Beobachtungen von Miyoshi u.a. (29), die beim Menschen physiko-chemikalische Unterschiede zwischen dem Albumin Neugeborener und Erwachsener fanden. In die gleiche Richtung weisen Befunde von Kapitulnik u.a. (23), die eine Zunahme der Bilirubinbindungsaffinität des Plasmaalbumins mit steigendem Alter des Säuglings feststellen konnten. Vorausgesetzt, auch bei Ratten besäße das fetale Albumin eine geringere Bilirubinbindungskapazität, so führte dies ebenfalls zu einem höheren Ausfall von UB bei den Jungtieren.

Die Vergleiche unterschiedlich gut ernährter, junger Ratten ergaben bis zum 12. Tag für die besser ernährten Tiere gering höhere TB-Werte als für die schlechter ernährten, während bei UB das Verhältnis umgekehrt war. Auf diese positive Korrelation zwischen Mangelernährung und positivem Ausfall des SGF waren schon Korn (26) und Schweitzer (46) gestoßen. Demgegenüber führt ein nur vorübergehender Nahrungsentzug zu einer anderen Ausprägung der Serum-Bilirubin-Konzentrationen, wie modifizierte Versuche von Barrett (5) und Satoh und Semba (39) zeigen. Letztere fanden bei 15 Tage alten Gunn-Ratten, deren eine Gruppe 16 Stunden gefastet hatte, einen mittleren TB-Wert von 12,44mg/dl und bei den weiterhin gesäugten Tieren ein TB von 8,17mg/dl. Umgekehrt war UB bei den Tieren mit Nahrungsentzug auf 0,10µg/dl abgefallen, während die weiterhin säugenden Tiere Werte von 0,47µg/dl aufwiesen (Ausgangswerte werden nicht mitgeteilt). Interessanterweise waren jedoch, wie sich in Anschlußversuchen gezeigt hat (40), bei den schlecht ernährten Tieren die Bilirubinkonzentrationen im Kleinhirn signifikant höher als bei den normal ernährten. Die Autoren führen die höheren UB-Plasma-Konzentrationen bei den weiterhin gesäugten Tieren auf den hohen Lipidanteil in der Rattenmilch zurück. Offensichtlich hat ein nur vorübergehender Nahrungsentzug gegensätzliche Wirkung auf die Bilirubinkonzentrationen im Vergleich zu einer mangelhaften Ernährung von Geburt an, als deren Folge auch deutlichere Gewichtsunterschiede bei meinen Wurfhälften zu beobachten waren (mittlere Gewichtsdifferenz in unseren Versuchen: Wurf 1 am 4.Tag 2,8g, am 12. Tag 8,1g; Wurf 2 am 5.Tag 3g, am 12. Tag 9,5g; bei Sato (40) nach 16 stündiger Nahrungskarenz 0,3g). Eine dauerhafte Mangelernährung mit konsekutivem Untergewicht relativierte demnach die Bedeutung der Zufuhr von freien Fettsäuren, die für sich, weil sie mit dem Bilirubin um die Albuminbindungsstelle konkurrieren (9), zu einem Anstieg von UB führen.

Daß Sulfonamide nach ihrer Applikation zu einem Absinken der Serum-Bilirubinkonzentration führen, ist experimentell seit den wegweisenden Arbeiten von Johnson und Mitarbeitern durch zahlreiche Studien hinreichend belegt (Odell in (33), Ballo-

witz/Hanefeld (3), Schutta/Johnson (45)). In Versuchen an 3-5 Monate alten Gunn-Ratten beobachteten Yeary und Davis (56) 30 Minuten nach der Injektion von 100mg/kg KG Sulfadimethoxin bei Ausgangswerten zwischen 5-11mg/dl einen durchschnittlichen Abfall des Bilirubins im Serum von 5,32mg/dl. Korn (26) gibt in seiner Arbeit für 5-10 Tage alte Tiere einen Abfall von 9,8mg/dl auf 4,9mg/dl nach 5 Minuten an. Nach 35-60 Minuten fand er einen Wert von 4,0mg/dl (=40,8% des Ausgangswertes). Schmid (42) teilt für 2-3 Tage alte Tiere 30 Minuten nach Injektion von 50/100 mg/kg KG einen Abfall von TB um ca. 32% mit. In meinen Versuchen fiel das Bilirubin bei Jungtieren (7-11Tage alt) nach 5 Minuten von 14,6mg/dl auf 6,18mg/dl (=42,2% des Ausgangswertes) und bei den 2-3 Monate alten Ratten von 7,13mg/dl auf 2,34mg/dl (=32,8% des Ausgangswertes). Sie liegen somit im Rahmen der in der Literatur mitgeteilten Werte.

Als Wirkungsmechanismus für diesen Konzentrationsabfall des Bilirubins kann nach Brodersen (8) angenommen werden, daß das Sulfonamid Bilirubin kompetitiv von seiner Bindungsstelle am Albuminmolekül verdrängt. Auf molekularchemischer Ebene scheinen für diesen Angriff auf das Albuminmolekül nach Scholtan (44) hydrophobe Gruppen im Sulfonamid, also besonders der (aromatische) Benzolring im Sulfonamidgerüst, ausschlaggebend zu sein. Die hydrophoben Gruppen schieben sich in zwei in der Tertiärstruktur des Albuminmoleküls gegenüberliegende aromatische Aminosäurereste (Schmid (42)) und führen zu einer Aufweitung und Schwellung des Albuminmoleküls. Verursacht durch Entropieeffekte und durch van-der-Waal'sche Kräfte (Dispersionskräfte) entwickelt sich nun eine relativ starke Bindungskraft zwischen den gegenüberliegenden Molekülresten. Je mehr hydrophobe Nebengruppen der Benzolring hat, umso stärker lipophil ist das Sulfonamid und umso stärker wird die zwischen ihm und dem Albumin sich entwickelnde Bindungskraft sein. Mit Hilfe dieses Modells ließe sich die unterschiedliche Stärke der Proteinbindung bei verschiedenen Medikamenten erklären. Neben der Affinität eines Medikamentes zum Albuminmolekül ist für das Ausmaß des bilirubinverdrängenden Effektes die Medikamen-

tenkonzentration entscheidend. Nur am Rande sei vermerkt, daß die Serum-Konzentration eines Medikamentes von dessen pharmakokinetischen Eigenschaften, also Resorption, Verteilungsvolumina und seiner Elimination abhängig ist (Forth u.a.(18)). Mit einer unterschiedlichen Affinität zum Albuminmolekül, ausgedrückt durch unterschiedliche Bindungskonstanten, einer unterschiedlichen Konzentration und spezifischer Pharmakokinetik wären demnach die jeweiligen Auswirkungen der einzelnen Medikamente auf die Höhe von Bilirubin in unseren Versuchen zu erklären, wobei der gewählte Versuchsaufbau nicht zuläßt, die Wertigkeit des einzelnen Faktors quantitativ zu erfassen.
Für Bucolome^{R} wurde bei 7-11 Tage alten Gunn-Ratten 30 Minuten nach s.c. Injektion ein Abfall von TB von 14,44mg/dl auf 3,97mg/dl (=27,5% des Ausgangswertes) gefunden. Nach einer Stunde betrug TB 3,76mg/dl (=26% des Ausgangswertes). Semba u.a. (48) injizierten die doppelte Dosis (100mg/kg KG) des gleichen Medikaments 15 Tage alten Gunn-Ratten, von denen allerdings kein Tier überlebte. In Übereinstimmung zu meinen Versuchen sank TB von einem vergleichbaren Ausgangswert auf 24% nach 30 Minuten und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum von 6 Stunden auf etwa derselben Höhe.
Für das dritte untersuchte Medikament, Coffein-Na-Benzoat, das in den Untersuchungen von Ballowitz und Hanefeld (3) in einer Dosis von 100mg/kg KG homozygoten Jungtieren verabreicht wurde, ist aus der Graphik (Werte werden nicht mitgeteilt) nach 30 Minuten ein TB-Abfall von ca. 30% gegenüber dem Ausgangswert zu entnehmen, womit der Wert um rund 8% höher liegt als in meinen Versuchen. Nach 24 Stunden lag die mittlere Serum-Bilirubin-Konzentration um rund 35% höher als die Ausgangskonzentration, was recht gut in meinen Versuchen reproduziert werden konnte. Dieser Anstieg dürfte auf die diuretische Wirkung von Coffein-Na-Benzoat zurückzuführen sein. Nach 24 Stunden ist bei den mit diesem Medikament behandelten Jungtieren ein Gewichtsabfall zwischen 3g und 4g festzustellen,, bei den älteren Tieren beträgt er 6-9g. Bei den anderen eingesetzten Medikamenten war keine vergleichbare Veränderung des Gewichts zu beobachten.

Legt man das gängige Paradigma einer Verdrängung des Bilirubins von seiner Albuminbindungsstelle durch Medikamente für die Erklärung des Abfalls von TB nach Medikamentenapplikation zugrunde, so wäre daraus ein Anstieg der Konzentration freien Bilirubins im Serum zu folgern. Zu dementsprechenden Ergebnissen in vivo kamen für das Medikament Madribon^{R} Yeary und Davis (56), die UB mit dem SGF-Test nachwiesen. In Versuchen an 3-5 Monate alten Gunn-Ratten betrug dieser Anstieg 5 Minuten nach Applikation rund 5%, nach 4 Stunden etwa 10% (Absolutwerte werden nicht mitgeteilt). Für ein anderes Medikament der Sulfonamidklasse, Sulfisoxazol, lieferten Levy und Oie (34), die mit dem Peroxidase-Verfahren nach Jacobsen und Fedders (21) arbeiteten, gleichlautende Befunde bei i.v. Injektion. Bei dieser Applikationsform konnte an ausgewachsenen Sprague-Dawley-Ratten ein Anstieg des UB von 3,4µg/dl auf 12,6µg/dl nachgewiesen werden. Wurde das Medikament jedoch per Dauerinfusion verabreicht, blieb UB konstant. Schon eingangs wurde die Untersuchung von Korn (26) angeführt, der bei jungen Ratten die Auswirkungen von dem auch von mir eingesetzten Medikament auf UB mittels der SGF testete. UB war nach Medikamentengabe im Serum bereits nach einer halben Stunde nicht mehr nachweisbar. Eine höhere Rate von negativen SGF-Testergebnissen nach s.c. Injektion von 100mg/kg KG Sulfadimethoxin fand ebenfalls Schweitzer (46) bei jungen und ausgewachsenen Ratten. Die Blutennahme war 20 Minuten nach der Injektion erfolgt. Die von uns erhobenen Werte, die auch sehr kurze Zeiten nach Medikamentengabe einschlossen, zeigen für jedes Tier jeden Alters einen Abfall von UB. Mehr noch, der parallele Kurvenverlauf zu TB zeigt an, daß TB und UB stets in einem relativ konstanten Verhältnis zu einander vorliegen, so daß man annehmen kann, - so auch Levy und Oie (35) -, daß zwischen ihnen ein Fließgleichgewicht besteht. Dieser Befund trifft auch für das Medikament Bucolome^{R} zu. Zu gegenteiligen Ergebnissen kam Semba (48): 30 Minuten nach s.c.Injektion erhob er mittels der SGF einen Anstieg von UB von 100µg/dl ! auf 353µg/dl, der auf diesem hohen Niveau mehr als 6 Stunden persistierte. In sämtlichen von mir durchgeführten Versuchen

konnte ich in keinem einzigen Fall eine so exorbitant hohe Ausgangs-Konzentration von UB, geschweige denn dermaßen hohe UB-Werte nach Medikamentengabe finden.
Die bei dem letzten eingesetzten Medikament, Coffein-Na-Benzoat, erhobenen Untersuchungsergebnisse sind grundsätzlich kompatibel zu den beiden anderen Medikamenten. Der Abfall von UB ist jedoch im Vergleich zu den anderen Medikamenten geringer, ein Befund, der übereinstimmt mit den Ergebnissen der in-vitro-Versuche. Der sicherlich interessante Vergleich der tatsächlichen Serumkonzentrationen der einzelnen Medikamente konnte wegen der beschränkten Laborausstattung des KAV nicht durchgeführt werden.
Die beschriebenen Veränderungen von UB nach Medikamentengabe lassen zwei Erklärungsansätze zu. Der weitergehende besteht in der Verneinung der Tauglichkeit des eingesetzten Peroxidase-Verfahrens zur Erfassung der UB-Fraktion in Ratten-Serum. Gegen diese Annahme sprechen die Ergebnisse der in-vitro-Versuche, die konsistent erscheinen und übereinstimmen mit der herrschenden Vorstellung über den Mechanismus der Bilirubin-Albuminbindung und der Affinität bestimmter Medikamente zu dieser Bindungsstelle. Darüberhinaus liegen eine Reihe methodologischer Untersuchungen vor, die die Objektivität und Validität dieser Methode belegen (Brodersen/Bartels (12), Ahlfors (1)) und ihr insbesondere eine höhere Sensitivität bei niedrigen UB-Serum-Konzentrationen zusprechen (Cashore et. al. (13). In der vergleichenden Untersuchung zwischen SGF und einem Peroxidase-Verfahren stießen Cashore et. al. (13) auf den interessanten Befund, daß die mittels der SGF ermittelten UB-Werte bis zum 100-fachen höher waren als die mit Peroxidase ermittelten. Sie führen dies darauf zurück, daß in der SGF-Säule nicht nur UB, sondern auch lose an Albumin gebundenes Bilirubin absorbiert wird. Auch unsere UB-Werte liegen - gegenüber Semba deutlich - niedriger als die in der gesichteten Literatur, so vor allem bei den älteren Tieren. Vor diesem Hintergrund erscheint es dann durchaus denkbar, daß die von Korn (26) und Schweitzer (46) notierten positiven SGF-Teste nach Medikamentengabe bei älteren Tieren höhere UB-Werte vermuten

ließen, als der tatsächlichen Konzentration entsprach, weil lose gebundenes Bilirubin mitregistriert wurde. Die Autoren haben eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Differenz im Ausfall von UB bei jungen und erwachsenen Tieren angeboten. Sie bezogen sich dabei auf Untersuchungen von Davis und Yeary (15), die die Gewebsverteilung von ^{14}C-markierten Bilirubin bei jungen und bei alten Ratten untersuchten und dabei unterschiedliche Anreicherungsraten in einzelnen Geweben zu identifizieren vermochten. Bei neugeborenen Ratten wanderte das durch eine Sulfadimethoxin-Injektion freigesetzte Bilirubin in das Intestinum (und die Leber) ab, während es bei den älteren Ratten hauptsächlich in der Leber nachweisbar war. Diese Beobachtung, daß freies Bilirubin in andere Gewebe diffundiert und zudem unterschiedliche Diffusionsrichtungen einschlägt, leitet über zu dem anderen Erklärungsansatz für den ausbleibenden Anstieg von UB nach Medikamentengabe. Denn wenn das eingesetzte Peroxidaseverfahren valide ist, was unsererseite nur unterstellt, wegen des Verzichts auf Referenzmethoden (z.B. Wennberg et al. (51)) aber nicht verifiziert werden konnte, so muß vermutet werden, daß UB unmittelbar nach dem Freisetzen vom Albumin an andere Rezeptoren gebunden wird und so dem Nachweis entgeht. In meinen Versuchen konnte ich zeigen, daß die Einstellung eines neuen Gleichgewichts recht schnell vonstatten geht: so war UB schon 3-5 Minuten nach Medikamentenapplikation abgefallen. An welche Rezeptoren in welchen Geweben UB diffundiert, war mit unserem Verfahren nicht auszumachen. Aus Befunden von Levy und Oie (34), die einen Anstieg der Bilirubinkonzentration in Erythrozyten nach Medikamentengabe fanden und aus den Arbeiten von Semba (48) und Davis und Yeary (15), wonach UB im Kleinhirn der Tiere angestiegen war, lassen sich jedoch mögliche target-Zellen mutmaßen. Hier können nur weitere Forschungsarbeiten Klarheit bringen.

Sollten die Versuchsergebnisse auch auf den Menschen übertragbar sein, so resultiert in jedem Fall die Erkenntnis, daß mittels des Peroxidaseverfahrens ermittelte UB-Werte keine gegenüber der Bestimmung der Gesamtbilirubin-Konzentration aussagekräftigeren Auskünfte über die drohende Gefahr eines Kernikte-

rus geben können. Selbst wenn das Verfahren die an jedes Nachweisverfahren zu stellenden Kriterien der Validität, Objektivität und Reliabilität erfüllen sollte, machen die Beobachtungen einer gleichen Veränderungsrichtung von TB und UB in nahezu fixer Relation nach Medikamentengabe die Ablösung/Erweiterung der bisherigen labor-klinischen Routinemethoden zur Abschätzung des Kernikterusrisikos bei Neugeborenen durch das automatisierte Peroxidase-Mikro-Bestimmungsverfahren unnötig.

5. Zusammenfassung

Der Einfluß von Medikamenten auf das Serum-Bilirubin wurde in vitro und in vivo untersucht. Es sollte geklärt werden, ob durch differenziertere Bestimmungen das Risiko eines Kernikterus besser abzuschätzen ist, als es mit dem bisher in der Klinik hauptsächlich erfaßten Gesamtbilirubinwert möglich ist.
Als Methode zum Nachweis von Gesamtbilirubin (TB) und ungebundenem Bilirubin (UB) wurde ein automatisiertes Peroxidase-Mikro-Bestimmungsverfahren eingesetzt.
Es wurden folgende Medikamente verabreicht:
Madribon^{R}, ein Sulfonamidabkömmling,
Bucolome^{R}, ein Barbitursäurederivat,
Coffein-Natrium-Benzoat, das als Respirationsstimulans in der Neugeborenentherapie Verwendung fand.
Von allen drei Medikamenten war bekannt, daß sie Bilirubin aus der Albuminbindung verdrängen.
Bei den in-vitro-Versuchen wurden Verdünnungsreihen der Medikamente angelegt. Diese wurden einem Gunn-Rattenserum und dem Serum von einem ikterischen Kind zugegeben. Es zeigte sich ein Absinken von TB und ein Anstieg von UB. Die Veränderungen fielen bei Coffein-Na-Benzoat am geringsten aus.
Als Versuchstiere für die in-vivo-Versuche dienten homozygote (ikterische) Gunn-Ratten unterschiedlichen Alters (5-12 Tage alt und 1-3 Monate alt). Bei 59 unbehandelten Jungtieren wurde ein Anstieg von TB zwischen dem 3.-12. Lebenstag (TB von 9,77mg/dl auf 15,72mg/dl) gefunden. UB lag zwischen 1,66µg/dl und 2,57µg/dl. Die 25 mehr als 1 Monat alten Tiere weisen TB-Werte zwischen 4,76mg/dl und 8,85mg/dl und ein UB um 1,35µg/dl auf.
Zur Klärung der Schwankungsbreite von TB und UB und ihren Relationen zueinander wurden Versuche mit unterschiedlichen Ernährungsbedingungen durchgeführt. Beim Vergleich von Ratten aus identischen Würfen, die über unterschiedliche Säugebedingungen verfügten, wiesen die besser ernährten gering höhere TB-Werte (um etwa 1mg/dl) auf als die schlechter ernährten.

Hinsichtlich des UB war eine andere Ausprägung festzustellen: Das UB lag bei den schlechter ernährten Wurfhälften zwischen 0,23µg/dl und 1,25µg/dl höher als bei den Tieren, die über Luxusernährungsbedingungen verfügten.
Nach Gabe von 100mg/kg KG Sulfadimethoxin war bei sieben Jungtieren (7-11 Tage alt) ein TB-Abfall auf 26,2% des Ausgangswertes 60 Minuten nach s.c. Injektion festzustellen. Nach 24 Stunden war TB wieder angestiegen. UB war in der gleichen Zeit auf 18,4% des Ausgangswertes abgesunken.
Die Applikation des Medikaments führte bei den sieben 1-3 Monate alten Tieren ebenfalls zu einem kurvenparallelen Absinken von TB und UB.
Wurde beiden Altersgruppen der Tiere das Medikament Bucolome^{R} in einer Dosierung von 50mg/kg KG s.c. verabreicht, so fielen die Veränderungen von TB und UB betragsmäßig ähnlich wie bei dem Sulfonamidpräparat aus. Ein Abfall von TB und UB konnte auch nach Gabe von Coffein-Na-Benzoat in beiden Altersgruppen nachgewiesen werden. In der gewählten Dosierung von 200mg/kg KG für die alten und 100mg/kg KG für die jüngeren Tiere war der Abfall im Vergleich zu den beiden anderen Medikamenten diskreter. Bei diesem Medikament wurden 24 Stunden nach Injektion in beiden Altersgruppen die Ausgangswerte von TB und UB überschritten. Dies dürfte in Anbetracht der zu beobachtenden deutlichen Gewichtsabnahme der Tiere auf eine Exsiccose als Folge der bekannten diuretischen Wirkung von Coffein-Na-Benzoat zurückzuführen sein.
Das Verhalten von TB und UB nach Medikamentengabe in den in-vitro-Versuchen stimmt überein mit dem herrschenden Konzept einer kompetitiven Verdrängung von Bilirubin aus der Albuminbindung durch Medikamente. Die Ursache für den ausbleibenden Anstieg von UB nach Medikamentengabe bei den in-vivo-Versuchen in beiden Altersgruppen ist hingegen nicht eindeutig zu erklären. Wird nicht das Nachweisverfahren zur Erfassung von UB als untauglich angesehen, wogegen der Ausgang der in-vitro-Versuche spricht, so muß angenommen werden, daß UB unmittelbar nach dem Freisetzen aus der Albuminbindung an andere Gewebsrezeptoren diffundiert. Als mögliche target-Zellen werden

unter Rekurs auf Beobachtungen von Levy und Oie (34), Semba (48) und Davis und Yeary (15) Erythrozyten, Kollagen und Fettgewebe, sowie das Gehirn angenommen. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß mit dem neuen Nachweisverfahren eine bessere Abschätzung der drohenden Gefahr eines Kernikterus in der klinischen Praxis nicht möglich ist.

6. Literaturverzeichnis

(1) Ahlfors, C.E., (1981)
Effect of serum dilution on apparent unbound bilirubin concentration as measured by the peroxidase method
Clin. Chim., 27(5), 692-696

(2) Ballowitz, L., (1980)
Bilirubin enzephalopathy: Changing concepts
Brain Dev., 2, 207-215

(3) Ballowitz, L., Hanefeld, F., (1976)
Effect of drugs on infant Gunn rats under phototherapy
Birth Defects, Vol XII, No 2, 61-80

(4) Ballowitz, L., Hanefeld, F., Jerofke, R., Keller, P., Korn, J., Schweitzer, U., (1978)
Sephadex-Gel-Filtration in infant and adult Gunn rats
Biol. Neonate, 33, 13-17

(5) Barrett, P., (1971)
The effect of diet and fasting on the serum bilirubin concentration in the rat
Gastroenterology, 60, 572-576

(6) Blondheim, S.H., Kapitulnik, J., Valaes, T., Kaufmann, N.A., (1972)
Use of a Sephadex column to evaluate the bilirubin-binding capacity of the serum of infants with neonatal jaundice
Israel J. Med. Sci., 8, 22-28

(7) Brodersen, R., (1974)
Competitive binding of bilirubin and drugs to human serum albumin studied by enzymatic oxidation
J. Clin. Invest., 54, 1353-1364

(8) Brodersen, R., (1976)
The mechanism of drug-induced displacement of bilirubin from albumin
in: Stern, L., (Ed.), Intensive care in the newborn, Vol.I, New Yorck, 177-184

(9) Brodersen, R., (1978)
Free Bilirubin in blood plasma of the newborn: Effects of albumin, fatty acids, pH, displacing drugs, and phototherapy
in: Stern, L., Kildeberg, P., Friis-Hansen, B., (Ed.), Intensive care in the newborn, Vol. II, New Yorck, 331-345

(10) Brodersen, R., (1978)
Determination of the vacant amount of high-affinity bilirubin binding site of serum albumin
Acta Pharmacol. Toxicol., 42, 153-158

(11) Brodersen, R., (1981)
Bilirubin interaction with albumin and tissues
in: Stern, L., Salle, B., Friis-Hansen, B., (Ed.), Intensive care in the newborn, Vol. III, New Yorck, 105-113

(12) Brodersen, R., Bartels, P., (1969)
Enzymatic oxidation of bilirubin
Eur. J. Biochem., 10, 468-473

(13) Cashore, W.J., Monin, P.J.P., Oh, W., (1978)
Serum bilirubin binding capacity and free bilirubin concentration: A comparison between Sephadex G-25 Filtration and peroxidase oxidation techniques
Pediat. Res., 12, 195-198

(14) Chunga, F., Lardinois, R., (1971)
Separation by gel filtration and microdetermination of unbound bilirubin
Acta Paediat. Scand., 60, 27-32

(15) Davis, R.D., Yeary, R.A., (1975)
Affect of sulphadimethoxine on tissue distribution of ^{14}C-bilirubin in the newborn and adult hyperbilirubinaemic Gunn rat
Ped. Res., 9, 846-850

(16) Diamond, I., Schmid, R., (1966)
Experimental bilirubin encephalopathy. The mode of entry of Bilirubin-^{14}C into the central nervous system
J. Clin. Invest., 45, 678-689

(17) Fa. Merck AG (1960)
Index Merck
Weinheim

(18) Forth, W., Henschler, D. Rummel, W., (1980)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Mannheim, Wien, Zürich

(19) Fujisawa, (1982)
UB analyzer UAF-1, operation manual
o.O.

(20) Jacobsen, J., (1969)
Binding of bilirubin to human serum albumin: Determination of the dissociation constants
Fed. Eur. Bioch. Soc., Lett. 5, 112-114

(21) Jacobsen, J., Fedders, O., (1970)
Determination of non-bound bilirubin in human serum
Scand. Clin. Lab. Invest., 26, 237-241

(22) Johnson, L., Sarmiento, F., Blanc, W.A., Day, R., (1959)
Kernicterus in rats with an inherited deficiency of glucuronyltransferase
Am. J. Des. Child., 97, 591-608

(23) Kapitulnik, J., Horner-Mibashan, R., Blondheim, S.H., Kaufmann, N.A., Russell, A., (1975)
Increase in bilirubin-binding affinity of serum with age of infants
J. Pediat., 86, 442-445

(24) Katoh, R., Kashiwamata, S., Niwa, F., (1975)
Studies on cellular toxicity of bilirubin: Effect on the carbohydrate metabolism in the young rat brain
Brain Research, 83, 81-92

(25) Katoh-Semba, R., (1976)
Studies on cellular toxicity of bilirubin: Effect on brain glycolysis in the young rat
Brain Research, 113, 339-348

(26) Korn, J., (1977)
Korrelation zwischen Serum-Bilirubin-Gehalt, Sephadex-Gel-Filtrationstest und Kernikterus - Experimentelle Untersuchungen an Gunn-Ratten
med. Inaugural-Diss., Freie Universität Berlin

(27) Laniado, M., (1981)
Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß einiger neuerer antibiotischer Präparate auf das Serum-Bilirubin und den Kernikterus der jungen Gunn-Ratte
med. Inaugural-Diss., Freie Universität Berlin

(28) Martin, N.H., (1949)
Preparation and properties of serum and plasma proteins XXI. Interactions with bilirubin
J. Am. chem. Soc., 71, 1230

(29) Miyoshi,K., Saijo, K., Kotani, Y., Kashiwagi, T., Kawai, H., (1966)
Characteristic properties of fetal human albumin (Alb F) in isomerization equilibrium
Tokushima J. Exp. Med., 13, 121-128

(30) Nakamura, H., Lee, Y., (1977)
Microdetermination of unbound bilirubin in icteric newborn sera: an enzymatic method employing peroxidase and glucose oxidase
Clin. Chim. Acta, 79, 411-417

(31) Nakamura, H., Lee, Y., Uetani, Y., Kitzunezuka, Y., Shimabuku, R., Matsuo, T., (1981)
Effects of phototherapy on serum unbound bilirubin in icteric newborn infants
Biol. Neonate, 39, 295-299

(32) Nathenson, G., Cohen, M.I., McNamara, H., (1975)
The effect of Na-Benzoat on serum bilirubin of the Gunn rat
J. Ped., 86, 799-803

(33) Odell, G.B., Cohen, S.N., Kelly, P.C., (1969)
Studies in kernicterus II. The determination of the saturation of serum albumin with bilirubin
J. Pediat., 74, 214-230

(34) Oie, S., Levy, G., (1979)
Effect of Sulfisoxazole on pharmacokinetics in experimental unconjugated hyperbilirubinaemia
J. Pharm. Sci., 68, 6-9

(35) Oie, S., Levy, G., (1979)
Effect of Salicylic Acid on pharmacokinetics of free and plasma protein-bound bilirubin in experimental unconjugated hyperbilirubinaemia
J. Pharmaceut. Sci., 68, 1-6

(36) Oie, S., Levy, G., (1977)
Interindividuell differences in the effect of drugs on bilirubin plasma binding in newborn infants and in adults
Clin. Pharmacol. Therap., 21, 627-632

(37) Rose, A.L., Wisniewski, H., (1979)
Acute bilirubin encephalopathy induced with Sulfadimethoxine in Gunn rats
J. Neuropath. exp. Neurol., 38, 152-164

(38) Rutkowski, R.B., (1967)
The determination of maximum bilirubin binding capacity of human albumin and serum by a calcium carbonate absorption technique
Clin. Chim. Acta, 17, 31

(39) Sato, H., Semba, R., (1977)
Effect of milk on plasma unbound-bilirubin concentration in homozygous Gunn rat sucklings
Experientia, 33, 59-61

(40) Sato, H., Semba, R., (1979)
Relationship between plasma unbound-bilirubin concentration and cellular bilirubin content in homozygous Gunn rat sucklings
Experientia, 34, 221-222

(41) Schiff. D., Chan, G., Stern, L., (1971)
Fixed drug combinations and the displacement of bilirubin from albumin
Pediatrics, 48, 139-141

(42) Schmid, H., (1976)
Der Einfluß von antibiotischen Präparaten und deren Lösungsvermittlern auf das Serum-Bilirubin der jungen Gunn-Ratte mit und ohne Phototherapie
med. Inaugural-Diss., Freie Universität Berlin

(43) Schmid, R., Diamond, J., Hammaker, L., Gundersen, C.B., (1965)
Interaction of bilirubin with albumin
Nature (London), 206, 1041-1043

(44) Scholtan, W., (1963)
Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums
Arzneimittel-Forschung, 13, 347-360

(45) Schutta, H.S., Johnson, L., (1969)
Clinical signs and morphologic abnormalities in Gunn rats treated with sulfadimethoxine
J. Ped., 75, 1070-1079

(46) Schweitzer, K.U., (1978)
Einfluß von Medikamenten, die Bilirubin aus der Albuminbindung verdrängen, auf den Sephadex-Gel-Filtrationstest
med. Inaugural-Diss., Freie Universität Berlin

(47) Segni, G., Polidori, G., Romagnoli, C., (1977)
Bucolome in prevention of hyperbilirubinaemia in preterm infants
Arch. Des. Child., 52, 549-550

(48) Semba, R., Sato, H., Yamamura, H., (1978)
Danger of bucolome^{R} in infants with hyperbilirubinaemia
Arch. Dis. Child., 53, 503-505

(49) Shimabuku, R., Nakamura, H., (1982)
Total and unbound bilirubin determination using an automated peroxidase micromethod
Kobe J. Med. Sci., 28, 91-104

(50) Wennberg, R.P., Ahlfors, C.E., Rasmussen, L.F., (1979)
The pathochemistry of kernicterus
Early Human Devel., 3/4, 353-372

(51) Wennberg, R.P., Rasmussen, L.F., Ahlfors, C.E., Valaes, T., (1979)
Mechanized determination of the apparent unbound unconjugated bilirubin consentration in serum
Clin. Chim., 25(8), 1444-1447

(52) Wiesmann, E., (1974)
Medizinische Mikrobiologie
Stuttgart

(53) Yamaji, K., Fujikake, M., Ohnishi, S., Ogawa, J., (1975)
Studies on interactions between albumin and bilirubin (IV). Effect of drugs on unbound bilirubin level and direct bilirubin fraction in unbound bilirubin
Acta neonatologica Japonica, 11, 76-77

(54) Yamamoto, T., Adachi, Y., (1974)
On the mechanism of action of bucolome^{R} in hyperbilirubinaemia
Acta Hepatica Japonica, 15, 607

(55) Yamamoto, T., Sakamoto, K., (1971)
Treatment of constitutional hyperbilirubinaemia
Acta Hepatica Japonica, 12, 173-175

(56) Yeary, R.A., Davis, D.R., (1974)
Protein binding of bilirubin: Comparison of in vitro and in vivo measurements of bilirubin displacement by drugs
Toxicol. Appl. Phamacol., 28, 269-283

(57) Zamet, P., Chunga, F., (1971)
Separation by gel filtration and microdetermination of unbound Bilirubin
Acta Paediat. Scand., 60, 33-38

Frau Prof. Dr. L. Ballowitz möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des Themas, für die Betreuung bei der Durchführung der Experimente, sowie für Anregungen und Kritik bei Abfassung der vorliegenden Arbeit.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. G. Wiese für seine hilfreichen Hinweise.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Tierpflegerin Frau R. Ludwig, der med.-techn. Assistentin Frau E. Goitia und dem Tierpfleger Herrn A. Dinzel.

Bei der deutschen Vertretung von Fujisawa: A. Johnson & Co., Erkrath, bedanke ich mich für die Leihe des UB-analyzers UAF-1, bei Fujisawa Pharmaceutical Co. für die Überlassung der Reagenzien.

Für großzügige Erlaubnis zur Benutzung des Textverarbeitungssystems des Instituts für Gesundheits- und Sozialforschung GmbH, Berlin, danke ich den Geschäftsführern, Herrn Dr. P. Debold und Herrn Dipl. Ing. W.F. Schräder. Für geduldige Unterstützung bei der technischen Fertigstellung der Arbeit gilt mein Dank Herrn U. Ruhl, Herrn W. Hilke und Frau U. Borker.

Lebenslauf

Am 4. Sept. 1953 wurde ich in Homberg/Alsfeld geboren. Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Georg-Büchner-Schule in Gießen. Danach ging ich auf das humanistische Landgraf-Ludwigs-Gymnasium, an dem ich 1972 das Abitur ablegte.
Im WS 1972/73 nahm ich das Studium der Rechts- und Sozialwissenschaften an der Justus-Liebig-Universität in Gießen auf. Zum SS 1973 wechselte ich an die Freie Universität Berlin, an der ich 1977 das Soziologie-Studium mit dem Diplom abschloß. Von Aug. 1977 bis Mai 1979 arbeitete ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Technischen Universität Berlin in Bremen an einem interdisziplinären Forschungsprojekt im Rahmen des Forschungsprogramms 'Humanisierung des Arbeitslebens'.
Im WS 1978/79 begann ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität, Marburg. Zum WS 1979/80 kehrte ich an die Freie Universität Berlin zurück. Von Juli 1982 bis Juni 1983 arbeitete ich an der Technischen Universität Berlin an einem Forschungsprojekt zur Bestimmung und Verbesserung der Pflegequalität in der Geriatrie. Im Okt. 84 legte ich die Prüfungen zum dritten Abschnitt des Staatsexamens ab.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen